

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО  
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Гришина Жанна Валерьевна

**БЕЛКИ, ПЕПТИДЫ И ФЕРМЕНТЫ ИХ ОБМЕНА  
В ОНТОГЕНЕЗЕ ЛИЧИНОК ТРУТНЕЙ И РАБОЧИХ ПЧЕЛ**

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание  
ученой степени кандидата  
биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
профессор М. Т. Генгин

Боровск – 2017

## **Оглавление**

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>9</b>
1.1 Перспективы применения продуктов пчеловодства в медицине, спорте и сельском хозяйстве.	9
1.2 Современные представления и особенности онтогенеза представителей пчелиной семьи.	11
1.3 Особенности белкового обмена насекомых в онтогенезе.	18
1.4 Пептиды и их роль в регуляции метаболизма насекомых.	33
1.5 Протеолитические ферменты и развитие насекомых.	38
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.</b>	<b>44</b>
2.1. Материал исследования.	44
2.2. Получение препаратов растворимых белков из личинок.	45
2.3. Определение активности протеолитических ферментов в экстракте личинок.	45
2.4. Электрофоретическое фракционирование растворимых белков личинок.	47
2.5. Разделение белков и пептидов личинок методом гель-фильтрация	48
2.6. Высокоэффективная жидкостная хроматография фракции пептидов личинок трутней и рабочих пчел.	48
2.7. Физиолого-фармакологические тесты для определения физиологических эффектов фракции пептидов, полученных из личинок трутней.	49
2.8. Статистическая обработка результатов эксперимента.	51
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.</b>	<b>52</b>
3.1. Количественное содержание белков и пептидов в личинках трутней и рабочих пчел на разных стадиях развития.	53
3.2. Разнообразие белков в личинках трутней и рабочих пчел на разных стадиях развития.	56

3.3. Исследование пептидной фракции в личинках трутней и рабочих пчел методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.	59
3.4. Активность катепсина D и трипсиноподобной протеазы в личинках трутней и рабочих пчел на разных стадиях развития.	64
3.5 Физиологические эффекты пептидной фракции личинок трутневого расплода.	72
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.</b>	<b>75</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>85</b>
<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>87</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	<b>88</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	<b>89</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>90</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Применение продуктов пчеловодства: маточного молочка, трутневого расплода, меда, пыльцы, перги, воска, прополиса в качестве природных аналогов синтетических лекарственных средств, практикуется уже довольно продолжительное время [16, 17, 25, 215, 221].

Препараты личинок трутневого расплода широко применяются в спорте в качестве пищевых добавок, богатых аминокислотами и витаминами [17]. В медицине известно использование препаратов из личинок пчел ввиду их положительного действия в широком спектре заболеваний [16]. Присутствие анаболического эффекта у препаратов личинок расплода пчел обуславливает их применение в сельском хозяйстве в качестве природного аналога химических гормонов [215, 221].

Ввиду выше сказанного, становится очевидным тот факт, что продукты пчеловодства занимают одну из лидирующих позиций среди других натуральных средств, которые могут стать безопасной и доступной альтернативой химическим препаратам [25]. В природе нет аналогов, которые бы могли конкурировать с продуктами пчеловодства по сбалансированности таких биологически активных веществ как аминокислоты, пептиды, белки, гормоны, углеводы, липиды, витамины, минеральные вещества, способных влиять на множество функций организма [6, 7, 16, 17, 20, 22, 25].

Особую роль во всех вышеперечисленных физиологических эффектах, которыми обладают препараты продуктов пчеловодства, занимают вещества, обладающие регуляторными свойствами, к которым относятся, в том числе, и регуляторные пептиды. Уровень данных пептидов в клетке в большой степени зависит от активности протеолитических ферментов (протеаз), под контролем которых находятся большое количество обменных процессов в развивающихся личинках и в любом другом живом организме. Протеазы, в последнее время, рассматриваются не только как инструмент распада белка,

поставляющего аминокислоты для синтеза новых белковых молекул, но и как важнейший регулирующий фактор обмена веществ [4, 15]. Акт гидролиза пептидной связи приводит к появлению нового белка (пептида) с другими физико-химическими и биологическими свойствам, что приводит к изменению ключевых процессов метаболизма в клетке [3, 4, 15]. Ввиду того, что регуляторные пептиды представляют собой отдельный класс физиологически активных веществ, играющих ключевую роль в регуляции и реализации разнообразных функций организма, их изучению в течение уже многих лет уделяется большое внимание [48, 51, 211].

К тому же, в последнее время сформировалась концепция о функциональной непрерывности, регуляторном континууме, состоящем из белков, пептидов, ферментов и сопряженных с ними межклеточных сигнализаторов небелковой природы [3, 4].

В то же время, регуляторные пептиды насекомых остаются недостаточно изученными, поскольку большой круг исследователей концентрирует свое внимание на изучении антимикробных пептидов насекомых [69, 168]. Это касается и регуляторных пептидов личинок трутневого расплода и рабочих пчел [11, 12, 13, 14, 27, 28]. Медоносная пчела в последнее время вызывает большой интерес исследователей как объект для изучения молекулярных механизмов регуляции клеточных процессов, поскольку в пчелиной семье имеются особи как с гаплоидным, так и с диплоидным набором хромосом. Причем, последние, обладая одинаковым геномом, не только затрачивают разное время на эмбриональное развитие, но и обладают запрограммировано различной продолжительностью жизни [26, 211].

В качестве объекта исследования использовали личинки трутней и рабочих пчел. На личиночной стадии их масса увеличивается в полторы тысячи раз за 6-7 суток, что позволяет говорить о наличии высокоэффективных регуляторных элементов, контролирующих чрезвычайно высокую интенсивность обмена веществ, не имеющей аналогов

в живой природе [6, 7]. К тому же, в последнее время в литературе стали появляться данные о физиологических эффектах препаратов пептидов, полученных из личинок трутней.

**Цель работы:** изучение количественного и качественного состава пептидов, белков в личинках трутней и рабочих пчел разного возраста, с целью обнаружения этапа развития личинок с максимальным содержанием пептидов, для дальнейшего изучения их физиологических эффектов.

Для достижения цели, были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить качественное и количественное содержание пептидов на разных стадиях развития личинок трутней и рабочих пчел.
2. Изучить качественный и количественный состав белков на разных стадиях развития личинок трутней и рабочих пчел.
3. Исследовать активность протеолитических ферментов метаболизма белков и пептидов в онтогенезе личинок трутней и рабочих пчел.
4. Выявить некоторые физиологические эффекты фракции пептидов, полученных из личинок трутней

**Личный вклад автора.** Все экспериментальные данные, изложенные в диссертации, а также их анализ, систематизация и оценка результатов выполнены лично автором под руководством д.б.н., профессора Генгина М.Т

**Научная новизна работы.** Впервые проведена сравнительная характеристика качественного и количественного состава белков и пептидов на разных стадиях развития личинок трутней и рабочих пчел. Впервые показаны закономерности изменения активности некоторых протеолитических ферментов, участвующих в метаболизме белков и пептидов на личиночной стадии трутней и рабочих пчел. Впервые обнаружены анксиолитический, ноотропный эффекты пептидной фракции молекулярной массой до 5 кДа, полученной из личинок трутней.

**Теоретическая и практическая значимость.** Установленные закономерности изменения количества и состава белков личинок трутней (гаплоидный набор хромосом) и рабочих пчел (диплоидный набор хромосом)

в процессе их развития дополняют представления об особенностях механизмов онтогенеза и закономерностях в обмене белков на личиночной стадии развития насекомых. Сравнительный характер исследований состава белков и пептидов в личинках трутней и рабочих пчел может свидетельствовать о кастовой дифференцировке механизмов экспрессии белков и генеза регуляторных пептидов. Установленная положительная зависимость между уровнем регуляторных пептидов и активностью трипсиноподобной протеазы, а также между количественным содержанием белков и активностью катепсина D, подтверждает представление о роли каждого из исследуемых ферментов в метаболизме белков и пептидов в клетке. Выявленные закономерности количественного и качественного содержания пептидов в личинках разного возраста позволит использовать личинки с максимальным содержанием пептидов для дальнейшего изучения их физиологических эффектов, с целью созданию природных аналогов синтетических препаратов и использования их в фармакологии, медицине, спорте и сельском хозяйстве.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Онтогенез пчелы медоносной на стадии личинки сопровождается положительной динамикой (увеличением) общего количества белка и обратной динамикой (уменьшением) количества пептидов.
2. Установлены различия в характере изменения активности одного и того же протеолитического фермента в процессе развития личинок двух разных каст.
3. Выявлена положительная корреляция между количественным содержанием белка и активностью катепсина D, а также между количественным содержанием пептидов и активностью трипсиноподобной протеазы.
4. Фракция пептидов молекулярной массой до 5 кДа, выделенная из личинок трутневого расплода, обладает анксиолитическим и ноотропным действием.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность результатов данного исследования основана на применении стандартных методик и сертифицированных приборов. Для проверки воспроизводимости

результатов, все эксперименты выполнялись в 4-6 параллельных повторах. Полученные результаты интерпретировали в соответствии с известными литературными данными. Сформулированные нами выводы полностью основаны на полученном экспериментальном материале.

Материалы диссертации доложены на всероссийских и международных научно-практических конференциях: Биология – наука XXI века: 16-я Международная Пущинская школа – конференция молодых ученых, 16 - 21 апреля, 2012 года Пущино (тезисы). III Международная научная конференция «Актуальные проблемы современной биохимии и клеточной биологии», 24-25 сентября, 2015 года. Днепропетровск, Украина (тезисы). II Международная научно-практическая телеконференция «Advances in Science and Technology», 25 декабря 2015 года (тезисы).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 6 статей в журналах, реферируемых ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из 7 разделов: введение, обзор литературы по теме диссертации, материалы и методы исследований, результаты исследования, обсуждение результатов исследования, выводы, практические предложения к применению результатов исследования. Работа изложена на 110 страницах, иллюстрирована 29 рисунками, 8 таблицами. Список литературы содержит 222 наименований на русском и иностранных языках.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Перспективы применения продуктов пчеловодства в медицине, спорте и сельском хозяйстве.

Современные условия существования человека: неблагоприятная экологическая обстановка, ухудшения качества продуктов питания, хронические стрессы, привели к росту числа вирусных, бактериальных и хронических заболеваний, что само собой, вызвало расцвет фармацевтической промышленности. Но, к счастью, в последние десятилетия все больше ученых концентрируют свое внимание на поиске природных аналогов синтетических лекарств, ввиду большого спектра их побочных эффектов, высокой стоимости и токсичности [6, 7, 16, 17, 20, 22].

Поиск природных биологически активных веществ ведется уже довольно продолжительное время. Что же касается биологически активных продуктов пчеловодства, то история их применения в медицине уходит к истокам зарождения медицины [41]. Но изучение их физиологических и биохимических эффектов с научной точки зрения началось сравнительно недавно. К настоящему времени в литературе накоплена обширная информативная база о применении препаратов продуктов пчеловодства в медицине. Подробно описываются их положительные фармакологические эффекты при заболеваниях печени, снижении иммунитета, вирусных и бактериальных инфекций и др. [15,25].

Еще одной областью широкого применения продуктов пчеловодства является спорт. Применение продуктов пчеловодства для восстановления после физических нагрузок, а также для повышения спортивной результативности имеет многолетнюю практику. Повышенный интерес к продуктам пчеловодства в спорте за последние десятилетия имеет несколько причин. Во- первых, широкий спектр лекарственных средств в спорте является запрещенным, во –вторых, многие синтетические лекарства

имеют противопоказания или побочные эффекты. В-третьих, при повышенных физических нагрузках организм спортсмена находится в постоянном стрессе, а применение синтетических лекарственных средств создает дополнительную нагрузку на организм [17].

В отличие от синтетических лекарственных средств, продукты пчеловодства не имеют побочных эффектов, не запрещаются антидопинговым комитетом и значительно дешевле синтетических аналогов. При исследованиях влияния продуктов пчеловодства на организм спортсменов была обнаружена способность маточного молочка и апикомпозиции «Апитонус» достоверно изменять уровень кальция, калия, натрия у спортсменов [17]. Также установлено изменение электролитного баланса под влиянием маточного молочка и его влияние на функциональное состояние надпочечников [17]. Включение в пищевой рацион комплексных препаратов, содержащих цветочную пыльцу, рекомендуется для коррекции гипокалиемии у спортсменов [17]. Мед и апикомпозиция «Апитонус» с его включением способны повышать уровень магния в крови, вследствие высокого содержания в своем составе электролитов [17].

Введенный запрет на использование стероидных гормонов в качестве кормовых добавок для увеличения прироста массы у бройлеров, свиней, рогатого скота, овец и др. стимулировал исследования продуктов пчеловодства в области сельского хозяйства [215, 221]. Половые стероиды влияют на развитие организма либо за счет увеличения синтеза белка через воздействие на внутриклеточные рецепторы, либо путем косвенной стимуляции экскреции гормона роста [221]. По этой причине половые гормоны используются в течение долгих лет у млекопитающих, особенно у крупного рогатого скота и овец, с целью повышения прироста мышечной массы. Но, использование анаболических соединений в животноводстве и птицеводстве сейчас запрещено в странах ЕС в целях защиты здоровья животных и уменьшения канцерогенного потенциала продуктов питания. Вслед за этим запретом, ученые начали поиск природных аналогов

стероидных гормонов, которые обеспечивали бы быстрый прирост массы за короткий промежуток времени. В исследованиях с применением продуктов пчеловодства в качестве добавок к корму сельскохозяйственных животных, показаны их антиоксидантное, противомикробное действие, иммуностимулирующее действия [221].

В последнее время пристально изучаются анаболические эффекты трутневого расплода и маточного молочка, возможность их применения у сельскохозяйственных животных, которые могут рассматриваться как естественная альтернатива химических веществ, используемых для стимуляции роста и полового развития [215, 221].

Таким образом, продукты пчеловодства являются не только «банком» биологически активных веществ, но и выступают перспективным аналогом синтетических средств во многих областях жизни людей. Они могут применяться как в качестве добавок к пище, так и в качестве лекарственного средства, не нанося при этом ущерб здоровью.

## **1.2. Современные представления и особенности онтогенеза представителей пчелиной семьи.**

Насекомые вида *Apis MELLIFERA* играют важную роль в опылении растений, поддерживая на нашей планете экологическое равновесие. Урожай многих цветковых растений зависит от опыления пчелами. Помимо опыления, пчелы также приносят пользу человечеству, производя широкий спектр продуктов пчеловодства [214]. Пчелы перерабатывают цветочный нектар в мед и хранят его в качестве основного источника питания в восковых сотах. Видовой состав, цвет и аромат меда зависят от цветов, из которых пчелы забирали пыльцу. Основными компонентами меда являются фруктоза, глюкоза и мальтоза, кроме сахарозы и других углеводов, мед также содержит небольшое количество белка, витаминов и минералов. Человек предпочитает его в качестве подсластителя не только потому, что мед имеет

особый аромат, но и потому, что он полезен для здоровья, так как обладает антибактериальной активностью [154]. Кроме меда пчелы производят и другие ценные продукты: воск, маточное молочко, прополис и тд...В Китае, например, средний экономический объем, пополняемый медоносной пчелой за счет опыления за 2006-2008 годы превышает 300 млрд китайских юаней, что составляет 12,3% ВВП сельского хозяйства в Китае [140].

Хотя пчелы играют жизненно важную роль в сельском хозяйстве в качестве опылителей растений, биология пчелы начала исследоваться лишь в начале 20-го века. Первые исследования медоносной пчелы посвящались определению пола, морфологии, а также были изучены вопросы, связанные с поведением, воспроизводством и этиологией. Например, искусственное оплодотворение маток, разделение труда пчел, и эмбриогенез. В течение ста лет, из-за технических ограничений, большинство исследований медоносной пчелы не выходило за рамки описания колоний, изучение медоносных пчел на молекулярном уровне сильно отставало от изучения дрозофилы [214].

Несмотря на то, что пчелы рассматриваются в качестве важнейшего модельного организма для понимания социального поведения насекомых, они оставались в значительной степени неисследованными на молекулярном уровне в области биологии развития, нейробиологии, генетики, иммунологии и старения. Эта ситуация колоссально изменилась после окончания расшифровки генома *A. MELLIFERA* в 2006 году. С этого времени исследование медоносной пчелы вышло на новый этап функциональной геномики [214].

Онтогенез пчелы включает 4 важных этапа: яйцо, личинка, куколка и имаго. Эмбрион пчелы имеет палочковидную форму. Для *A. MELLIFERA*, длина яйца составляет около 1,7 мм, а ширина около 0,35 мм [88]. Стадия яйца длится около 72 ч, в течение которых масса яйца уменьшается примерно на 30% [88]. Хотя в этот период кормления не происходит, но на стадии яйца начинается формирование органов [77].

К тому же, эмбрион пчелы имеет очень активный обмен веществ. Было установлено, что трутни начинают их морфогенез раньше, чем рабочие пчелы, и уровни морфогенеза родственных белков у них выше в эмбриогенезе. Трутни также синтезируют больше белков цитоскелета, обеспечивающих большой размер тела. Также было установлено, что трутни и рабочие пчелы используют разные антиокислительные механизмы [92].

Во время личиночной стадии, пчелы растут в геометрической прогрессии, женские пчелы дифференцируются в королев и рабочих пчел в ответ на их рацион питания [45]. Самым поразительным в личиночной стадии является то, что вес медоносной пчелы увеличивается приблизительно 1500 раз в течение всего 6 дней [68]. Сильная потребность в питательных веществах и энергии личинок коррелирует с накоплением энолазы, альдегиддегидрогеназы и синтазы жирных кислот. В то время как запасные белки начинают экспрессироваться только на шестой возрастной стадии, указывая на то, что личинка хранит аминокислоты для последующего метаморфоза [139]. Кроме того, изучение уровня факторов иммунитета показало положительную корреляцию со старением личинок. Эти результаты отражают созревание иммунной системы с развитием личинок, и могут дать объяснение, почему пчелы с возрастом становятся восприимчивы к бактериальным инфекциям или грибковым заболеваниям [68].

Было показано, что конкретные гены активируются для определения кастовой принадлежности во время личиночного развития [91, 113, 204]. Из существенных отличий в экспрессии белка в личинках маток и рабочей пчелы, было обнаружено, что судьба двух каст определяется до 72 ч [138]. Рассматривая ядерный и митохондриальный протеом личинок маток и рабочих пчел на 3-й, 4-й и 5-й стадии развития, обнаружены значительные качественные и количественные различия в экспрессии белка между двумя кастами на всех трех стадиях развития. Личинки маток активнее синтезируют белки метаболизма углеводов, а также аминокислоты и жирные кислоты

Изменения белков и ферментов между двумя кастами также обеспечивают понимание на субклеточном уровне полиморфизма пчелиной касты [55, 56].

Следующей стадией онтогенеза пчелы является стадия куколки. Пчелы не кормятся во время этой стадии, которая длится 13 дней. Во время окукливания пчел проходит постепенное формирование структуры тела в запечатанных воском ячейках, в том числе формируется голова, грудная клетка, брюшко и крылья [216]. Следующей стадией является взрослое насекомое или имаго. Сравнительная протеомика показывает, что изменение поведения пчел, согласно отведенным им ролям в пчелиной семье, может быть связано со структурными и биохимическими изменениями во всем теле рабочих пчел. Также есть данные о различии в активности ферментов, участвующих в синтезе АТФ, таких как фруктозо-1,6-бисфосфатная альдолаза, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH), енолаза, глюкозидаза. Активность данных ферментов значительно повышена в пчелах – фуражирах, чтобы поддерживать более высокую скорость обмена веществ во время полета, а у рабочих пчел – нянек выше активность ферментов, участвующих в синтезе маточного молочка [209].

При исследовании протеома головы рабочей пчелы – няньки, было установлено, что преобладают белки обонятельной системы и основные белки маточного молочка [100]. А также белки, связанные с клеточной адгезией, аксоногенезом и глиогенезом, белки секреции и везикулярного транспорта имеют более высокие уровни экспрессии у пчел – нянек. Это необходимо для созревания мозговых клеток молодых рабочих пчел. Тем не менее, у опытных сборщиц нектара более активная экспрессия белков и ферментов обмена веществ и выработки энергии, которые, возможно, отвечают и за обучение и запоминание [114].

Также была изучена в сравнительном аспекте нейропептидная картина пчел и маточного молочка. Было показано, что в ходе разделения труда у пчел лишь небольшое количество нейропептидов меняют свой уровень,

также было показано, что нейропептиды связаны с регуляцией выделения маточного молочка [110].

### **Кастовая дифференцировка пчел.**

Пчелиная семья представляет собой целостную биологическую систему, супер- организм, где каждая особь не может существовать отдельно. В ходе эволюции выработались механизмы поддержания гомеостаза внутри пчелиной семьи такие, как например - кастовая дифференцировка и распределение ролей внутри семьи, замена слабо плодовитой матки, изгнание трутней в конце лета для экономии корма зимой или содержание их небольшого количества для регулирования температуры внутри улья и тд. Данные механизмы являются выигрышной стратегией формирования устойчивой надорганизменной системой существования [26, 41, 117]. Расцвет определенной пчелиной семьи зависит от оптимального подбора каждого ее члена: и плодовитой матки, и крупных трутней, и рабочих пчел, приносящих пыльцу, ухаживающих за личинками и обеспечивающих «уют» в улье [117].

Здоровая пчелиная семья обычно имеет более 20000 пчел в летнее время. Пчелиная семья включает рабочих пчел, королеву (матку) и сотни трутней. Королева откладывает 1500 яиц каждый день в течение активного сезона, и начинают откладывать меньше яиц, когда температура окружающей среды падает. Во время зимы королева прекращает откладывать яйца, поэтому численность особей в улье сокращается до 10 000, что позволяет экономить еду. И королева, и рабочие пчелы развиваются из оплодотворенных яиц. Трутни - из неоплодотворенных яиц, то есть они содержат только половину хромосом [68].

Истоки появления социальных насекомых интересуют различных ученых довольно продолжительное время. Было показано, что сложная организация сосуществования пчел и становление их фенотипической архитектуры представляет собой результат эволюционного разделения труда. Причем роли, выполняемые пчелами в семье, изменяются у них с возрастом.

Недостаточное изучение трутней по сравнению с рабочими пчелами и матками может объясняться несколькими причинами [44, 95, 155, 181, 207]. Во - первых, они не представляют коммерческого интереса и находятся в пчелиной семье, как правило, только в летний период, после чего изгоняются рабочими пчелами. Если же осенью пчеловод обнаруживает в улье трутней, то это может свидетельствовать о гибели матки. Во- вторых, у трутней весьма ограниченные функции в пчелиной семье - это спаривание с маткой, которая может хранить их сперму довольно продолжительное время [165]. Для того чтобы спариться с маткой трутни вступает в конкуренцию с другими особями, поэтому в анатомии трутней наблюдаются выраженные адаптации к долгим полетам и сильное развитие чувствительных органов, например, длинные усики с множеством чувствительных клеток [180].

В отличие от трутней, у рабочих пчел происходит разделение выполняемых ими функций в пчелиной семье. Они следят за чистотой улья, вскармливают личинки, собирают пыльцу, производят воск и др. Исходя из таких значимых различий в выполняемых ролях рабочих пчел и трутней в пчелиной семье, между ними существуют весомые различия в физиологии, морфологии и стереотипах поведения [117].

Личинки рабочих пчел развиваются из оплодотворенных яиц, а личинки трутней из неоплодотворенных. Причем различия в размере яиц незначительны, но яйца рабочих пчел развиваются значительно быстрее, чем трутневые [111]. Частота дыхания этих двух видов яиц зависит от температуры, но не было найдено никакой разницы в количестве потребляемого кислорода между мужскими и женскими яйцами [145].

Причем, вклад рабочих пчел - нянек в развитие личинок трутней намного превосходит их вклад в развитие личинок рабочих пчел. Этим, возможно объясняется стремительное развитие личинок трутней и такое большое увеличение массы личинки [67]. Для личинок рабочих пчел было показано, что увеличение массы личинки в начале личиночной стадии имеет

генетический компонент [191]. Подобных исследований для личинок трутней не было произведено.

Кроме того, при развитии личинок разных представителей пчелиной семьи наблюдается разное кормление. Так, например, в первые три дня пчелы-няньки кормят маточным молочком личинок трутней, в остальные дни развития в корм добавляется мед и перга. Таким образом, на более поздних этапах развития (108 ч) трутневых личинок происходит переход от белкового питания к белково-углеводному, с преобладанием углеводного компонента. Что же касается личинок рабочих пчел, то питание их схоже с трутневым, но переход на белково-углеводное питание происходит раньше - через 84 ч [64, 65]. Это может быть связано с тем, что развитие личинок трутней запаздывает по сравнению с рабочими пчелами [185].

В отличие от взрослых особей рабочих пчел, которые в качестве запасных веществ содержат большое количество липидов и гликогена, их личинки содержат эти вещества лишь на некоторых стадиях развития. С увеличением возраста личинки происходит увеличение содержания белка, жира и гликогена [97, 147, 133]. Максимальное содержание липидов наблюдается на заключительной стадии развития личинок и уменьшается в процессе метаморфоза [80, 150, 190].

Что касается данных о химическом составе личинок трутней, тут информации значительно меньше. Картина накопления гликогена у личинок трутней похожа на таковую у личинок рабочих пчел. К концу личиночной стадии у трутней содержание гликогена также уменьшается, но содержание жира в личинках трутней выше, чем у рабочих пчел.

Что же касается содержания белка в личинках: у личинок рабочих пчел как и у личинок трутней с возрастом личинки наблюдается увеличение количества белка [150, 190]. Кроме того, Аллен обнаружил, что личинки трутней потребляют большее количество кислорода, по сравнению с личинками рабочих пчел, что может быть связано с более высокими темпами роста и метаболизма личинок трутней.

Достаточно много исследований посвящено энергетике полета пчел [112, 139, 157]. Так, например, было установлено, что запаса гликогена хватает на расстояние полета 200-300 м, остальное обеспечивается за счет быстроусвояемых углеводов [161].

### **1.3. Особенности белкового обмена насекомых.**

Большое практическое и теоретическое значение имеют исследования метаболизма насекомых. Этот интерес объясняется тем, что обмен веществ на протяжении жизненного цикла насекомого претерпевает существенные изменения при смене фаз развития. Скорость и направленность метаболических процессов, как известно, определяются ферментативными реакциями [10, 30]. Изучение ферментов, их строения и свойств у отдельных представителей насекомых находится на начальном этапе.

Как отмечают в своем обзоре Ю. Б. Филиппович и Н. И. Минина (1976), для ферментологии насекомых характерна «крайняя фрагментарность в онтогенетическом и видовом аспектах». В большинстве случаев исследованиям подвергались виды легкодоступные, являющиеся традиционно удобными объектами для биологов, такие как дрозофила, или полезные насекомые, такие как пчела, шелкопряды, муравьи, а также паразиты человека и животных [19, 30].

На начальном этапе изучения протеолитических ферментов насекомых, было установлено, что в процессе пищеварения при щелочном рН средней кишки доминируют сериновые протеазы: трипсин, химотрипсин и эластаза [172]. Процессы развития, наоборот, происходят при кислом значении рН и в них лидирующую роль выполняют такие ферменты как катепсины [172].

Протеолитические ферменты катализируют гидролитический распад пептидной связи и принимают участие в таких биологических процессах как: активация зимогенов, высвобождение гормонов и физиологически активных белков, транспорт через мембрану, в модификации белков и активации

рецепторов, а также входят в состав защитного барьера на поверхности тела насекомых [54, 160, 200].

Такой поверхностно - защитный барьер из комплекса протеаз характерен для большинства насекомых, в том числе и для медоносных пчел. Протеолитическая система как часть иммунной системы является гарантией защиты от инфекций и помогает поддерживать физиологический гомеостаз [65, 159]. Иммунная система медоносных пчел, как и других насекомых, имеет много сходств с врожденным иммунитетом позвоночных животных [188, 189]. Ферментативная деградация патогенных бактерий, грибов и паразитных клещей осуществляется протеолитическими ферментами, которые содержатся не только в гемолимфе и средней кишке, но и на поверхности тела [188, 189].

Протеолитические ферменты также являются «узловыми» ферментами пищеварения насекомых [8]. В пищеварительном тракте насекомых содержатся протеолитические ферменты, принадлежащие ко всем четырем механистическим (классифицированным по механизму действия) классам протеаз. Однако у представителей различных систематических групп имеются свои характерные особенности [8].

Так, у насекомых, принадлежащих к отряду чешуекрылых (*Lepidoptera*), к которому относятся многие наиболее важные вредители сельского хозяйства, первоначальное расщепление белков в пищеварительном тракте осуществляется преимущественно протеиназами серинового типа [212]. С помощью специфических субстратов и ингибиторов было установлено, что сериновые протеиназы в кишечнике различных *Lepidoptera* представлены трипсино-, химотрипсино- и эластазоподобными ферментами. Так, в экстрактах из кишечника табачной совки (*Heliothis virescens*) более 90% общей протеолитической активности приходится на долю трипсина и химотрипсина. У другого насекомого (*Lecanobia oleracea*) протеолитическая активность распределяется приблизительно поровну между трипсино-, химотрипсино- и эластазоподобными протеиназами. В

отличие от представителей отряда *Lepidoptera* у насекомых, относящихся к отряду жесткокрылых (*Coleoptera*), первоначальное расщепление белков в кишечнике осуществляется преимущественно цистеиновыми протеиназами [212]. У колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) основные пищеварительные ферменты представлены протеиназами, близкими по свойствам катепсинам H, L и B млекопитающих. Однако протеолитическая система колорадского жука является достаточно сложной и включает, кроме цистеиновых протеиназ, аспартильную протеиназу, напоминающую катепсин D, сериновую протеиназу типа химотрипсина, а также лейцинаминопептидазу и карбоксипептидазу A. В кишечнике другого представителя *Coleoptera*, долгоносика (*Hypera postica*), наряду с цистеиновыми протеиназами, катепсинами L и B, обнаружена аспартильная протеиназа типа катепсина D [8].

Следует отметить, что состав протеолитических ферментов в пищеварительном тракте некоторых насекомых может претерпевать определенные изменения в зависимости от стадии развития. Такое явление наблюдалось у хлопковой совки (*Helicoverpa armigera*). У личинок насекомого на пятой стадии развития более 90% ферментов пищеварительного тракта было представлено сериновыми протеиназами, тогда как на второй стадии развития обнаруживались ферменты других типов – аспартильные и металлсодержащие протеазы [8].

Определенные изменения в качественном и количественном составе протеолитических ферментов могут также наблюдаться у насекомых и при смене растения–хозяина [8].

Особое место в пищеварении занимают протеазы аспарагиновой кислоты (APs; EC: 3.4.23), обычно известные как кислые протеазы. Они широко распространены не только в растениях, но также и среди позвоночных животных, дрожжей, червей, паразитов, грибов и вирусов [82, 169]. Они найдены также у насекомых, например, сообщалось о пищеварительных аспартильных пептидазах, в таких насекомых как *Musca*

*domestica*, *Stomoxys calcitrans*, *Calliphora vomitoria*, *M. domestica* и *Sarcophaga ruficornis*, и *C. vicina* [94, 104, 134, 163, 184].

В *M. domestica* было обнаружено, что аспартильной пептидазой средней кишки является катепсин D- подобный фермент [135]. Другие насекомые в пищеварительном тракте также содержат аспартильные пептидазы с некоторыми особенностями, например, в Hemiptera [116] и Coleoptera [116, 210]. Низкий pH в среднем кишечнике Coleoptera и Hemiptera обеспечивает более благоприятные условия для APs (оптимум pH 3–5), чем высокий pH у большинства насекомых (оптимум pH 8–11), где аспартильные и цистеиновые протеиназы были бы не активны [116].

Другие виды насекомых имеют для AP следующие оптимальные pH: 3.5 у *Rhodnius prolixus* [193], 4.5 у *Leptinotarsa decemlineata* [194], 3.3 у *Callosobruchus maculatus* [182], 3.0 у *A. aegypti* [71], 3.0–3.5 у личинки *M. domestica* [135], 4.0 у *Parasarcophaga surcoufi* [89].

Эффект некоторых ингибиторов на активность APs важен также в защите растений. Ингибирование аспартильных пептидаз тиоловыми реагентами найдено ранее у других насекомых, таких как *R. prolixus* [116], *P. hertipes* [182], и *L. decemlineata* [194]. Ингибиторный анализ идентифицировал цистеиновые, аспартильные (катепсин D), сериновые (трипсиноподобные, химотрипсинподобные), протеазы и металлопротеазы активные при пищеварении у мучного жука [206], а соевый ингибитор трипсина токсичен для личинок мучного жука *Tribolium confusum* [141].

Изучение трипсиноподобных ферментов у насекомых в основном сводятся к изучению их роли в пищеварении. И хотя, в последнее время биохимия насекомых развивается достаточно интенсивно, данные о внутриклеточных трипсиноподобных ферментах насекомых очень скудны.

При исследовании пищеварения у медоносных пчел, установлено, что протеазы в содержимом средней кишки значительно активнее, чем в экстракте из ее стенок [15]. Активность протеаз в средней кишке изменяется с возрастом пчел, причем наибольшей величины она достигает у молодых

пчел (3—12 дней). В этом возрасте они усиленно питаются пергой и выделяют большое количество маточного молочка для выкармливания личинок. Установлено, что активность протеаз кишечника находится в прямой связи со степенью наполнения средней кишки пергой. Работы Жеребкина также подтверждают мнение Павловского и Зарина о наличии химозина в желудке пчелы.

Из средней кишки пчел выделено четыре фракции активных эндопептидаз. Было установлено, что две из них (В и С) не похожи на панкреатические протеазы млекопитающих, а во фракции Д обнаружены дополнительные компоненты. По мнению авторов, чтобы продуцировать 4 мг протеина в день, пчела должна расщепить 10 мг пыльцы, а это возможно только при использовании эндопептидаз, где каждый фермент имеет свою специфику [18,22].

В 1964 Апплебаум и соавторы предприняли попытку исследовать пищеварительные ферменты личинок мучного хрущака, *Tenebrio molitor*, поскольку было известно, что насекомое не росло при кормлении соей [200, 206]. Наибольшее содержание протеолитических ферментов было обнаружено в изолированной средней кишке личинок. Специфические субстраты и ингибиторы свидетельствовали о наличии карбоксипептидаза В-подобной и аминопептидазной активности, а также о типичной трипсиноподобной активности [200, 206].

Трипсин был частично очищен ионно-обменной хроматографией, он действовал на основные аминокислоты и полилизин. Активность подавлялась соевым ингибитором трипсина, хотя у сформированного комплекса была константа диссоциации выше, чем у комплекса бычий трипсин-ингибитор [52].

Пищеварительные протеазы *Tenebrio* были позже исследованы Pfleiderer и Zwilling, которые выделили две протеазы из взрослых жуков [222]. Первая из них (“альфа-протеаза”) имела молекулярную массу 24000 и ингибировалась PMSF, но не гидролизовала производные аргинина и

тирозина (BAEE или ATEE). Также были не эффективны TLCK и TPCK. Вторая (“бета-протеаза”) имела молекулярную массу 60000, но имела все признаки типичного трипсина. Она ингибировалась несколькими ингибиторами трипсина и TLCK, и PMSF, но не ингибировалась TPCK. У бета- протеазы была высокая активность к BAEE, но не было к ATEE и она не гидролизовала полилизин. Поэтому авторы пришли к заключению, что этот фермент идентичен личиночному “*Tenebrio trypsin*” Applebauina и др [131].

Когда деятельность бета-протеазы была проверена против белкового субстрата, никакая трипсиноподобная активность не наблюдалась. Бета-протеаза по отношению к белковому субстрату проявляла химотрипсинподобную активность, но по всем другим параметрам напоминала трипсин. Эксперименты ясно показывают, что выводы, сделанные из исследований со смесью ферментов и с использованием неспецифических субстратов, должны быть расценены с осторожностью и нуждаются в дальнейшем изучении, чтобы установить различие между этими двумя типами сериновых протеиназ [131].

Это, конечно, не означает, что у всех насекомых пищеварительные трипсиноподобные ферменты будут иметь аномальное действие на белки и пептиды. Таблица I суммирует свойства многих частично или полностью очищенных пищеварительных трипсинов насекомых [131].

Во всех случаях у этих ферментов, наблюдалась нормальная трипсиноподобная специфика к белковым субстратам, и хотя продукты реакции незначительно различались, это, вероятно, наблюдалось из-за загрязнения небольшими количествами других протеаз. Возможно, аномальные трипсины характерны для жуков, но, к сожалению, у нас нет информации о протеазах от жуков кроме *Tenebrio*[131].

Вард сообщил о присутствии нескольких подобных трипсину ферментов в моли *Tineola bisselliella* [203]. Вероятно, что некоторые из них получены из родительской полипептидной цепи протеолизом, почти таким

же как семейство трипсинов и химотрипсинов из сока поджелудочной железы млекопитающих [203]. В конечном счете, эта проблема может быть решена только изоляцией зимогенов. Также он сообщил о неудаче в обнаружении проферментов в гомогенате целого *T. bisselliella*, но они могут присутствовать в небольших количествах в эпителиальных клетках средней кишки [203]. Пищеварительные трипсины насекомых были изучены наиболее интенсивно, хотя активность химотрипсина, пепсина, карбоксипептидаз, аминопептидаз была обнаружена в нескольких видах насекомых. Из тех ферментов, которые были выделены и тщательно изучены, можно упомянуть химотрипсин шершня *Vespa orientalis* [131].

Пищеварительные ферменты и ферменты глюконеогенеза у шершня *Vespa orientalis*, как постулировалось ранее, играют роль в общественной организации. Взрослые особи не способны к деградации белка и преобразованию его в сахар. Личинки же содержат высокие уровни протеаз — химотрипсина и карбоксипептидаз А и В. Взрослые насекомые кормят личинок белком. Белок в средней кишке личинке преобразуется в сахар, который появляется в слюне. Взрослые используют личиночную слюну как источник пищи, которая богата сахаром и аминокислотами. Таким образом, в общественной организации насекомых существует биохимическое разделение труда [131].

Внутриклеточные протеолитические ферменты – уникальная для каждого типа клеток группа биологических катализаторов, в совокупности обеспечивающих обмен белка – важнейшего для живого организма процесса.

Протеолиз в той или иной степени обеспечивает все процессы, связанные с обменом белка в клетке с момента его синтеза на матричной РНК в рибосомах и до полного гидролиза «отработанного» белка [10, 38, 43]. Все без исключения структурные, функциональные белки, ферменты, гормоны пептидной природы, многочисленные по строению и функциям регуляторные пептиды находятся под контролем пептидгидролаз, что ставит в зависимость клеточный метаболизм и организм в целом от состояния

протеолитических ферментов, и на основании чего ферменты протеолиза можно характеризовать как глобальные регуляторы метаболизма [12].

Протеолитические ферменты относятся к числу наиболее изученных биологических катализаторов, это и не удивительно, ввиду их ключевой роли в обмене белков. Для большинства из них известны первичные структуры, пространственная организация молекул, топография активных центров и каталитические механизмы их действия [1, 5, 10, 115].

Пептидгидролазы представляют собой обширную группу биологических катализаторов. Они отнесены к четвертому подклассу третьего класса, в соответствии с принятой классификацией ферментов (К.Ф. 3.4.). Все они осуществляют реакции гидролиза пептидных связей внутри молекул белков и пептидов.

В основе классификации пептидгидролаз положены следующие принципы: специфичность действия, строение активного центра молекулы фермента и характер действия на белки (эндо- и экзопептидазы).

В настоящее время в зависимости от локализации в клетке и функциональной роли внутриклеточные ферменты разделяют на две группы. К первой группе относятся лизосомальные пептидгидролазы, а ко второй – ферменты внелизосомальной или цитоплазматической локализации [1, 5, 10, 115].

Гидролиз белков в клетке может протекать по разным путям – лизосомальному и нелизосомальному, однако, вклад в процесс деградации белков этих двух путей неодинаковый. Прежде всего, это определяется особенностями внутриклеточной локализации пептидгидролаз лизосом и цитоплазмы [1, 5, 10, 115].

Конечными продуктами гидролиза белка в лизосомах являются преимущественно свободные аминокислоты. То есть, другими словами, протеолитические ферменты лизосомального аппарата осуществляют полный гидролиз белка, оказавшегося внутри лизосом [70, 71].

Что же касается протеолитических ферментов нелизосомальной локализации, то по современным литературным данным известно, что они принимают участие в образовании физиологически активных форм белков. И этот путь является важнейшим при образовании физиологически активных форм биомолекул пептидной природы [30].

Что же характеризует протеолитические ферменты как особый класс регуляторных молекул в клетке? Это, прежде всего, быстрота осуществления каталитического акта и высокая экономичность действия ферментов. Долгое время функции протеолитических ферментов связывали исключительно с их ролью в деструктивных, катаболических процессах. Однако роль протеиназ не ограничивается процессами деструкции [43].

Все больший интерес привлекают к себе регуляторные функции этих ферментов, которые, несомненно, связаны с образованием регуляторных пептидов в процессе ограниченного протеолиза [12]. В этом случае, говорят не о полной деградации белка в клетке, а используют термин «протеолитическая модификация», поскольку термин «ограниченный протеолиз» свидетельствует лишь о том, что произошел гидролиз пептидной связи, и не указывает на образование молекул пептидной природы, обладающих регуляторными свойствами. Поэтому, на наш взгляд, термин «протеолитическая модификация» наиболее полно описывает функции внутриклеточных протеаз [10].

Протеолиз является одним из универсальных процессов живой природы, выполняющий важную роль в поддержании гомеостаза в клетке, который обусловлен, во многом, стационарными концентрациями белков, а чаще всего, именно гомеостаз клетки является прерогативой выживания организмов. Наиболее интенсивно процесс протеолиза наблюдается в активно делящихся и растущих клетках, характеризующихся повышенным белковым синтезом [1, 24].

Каким же требованиям должен соответствовать протеолитический аппарат клетки? Он, несомненно, должен обладать высокой

избирательностью и достаточно жестко регулироваться, поскольку повышенная деградация белков «узловых» процессов клетки или, наоборот, замедленная деградация регуляторных белков могут существенно изменить клеточные функции. Данные процессы требуют наличия в клетке надежных механизмов контроля, которые должны обеспечивать максимальную эффективность и высокую селективность внутриклеточного протеолитического аппарата [1, 24].

У живых организмов протеолитические ферменты появились на самых ранних стадиях эволюционного развития. Причем, поднимаясь по эволюционной ступеньке вверх, доля лизосомального пути деградации белка постепенно снижалась, уступая место, более тонко регулируемому пути цитоплазматического протеолиза. [1, 24].

### **Трипсиноподобная активность.**

Трипсиноподобную активность в клетке проявляют эндопептидазы с оптимумом действия рН 7-8. Эндопептидазы катализируют гидролиз пептидных связей внутри белковой молекулы. Цитоплазматической локализацией характеризуются только две эндопептидазы: кальпаин и мультикаталитический протеиназный комплекс, которые способны катализировать гидролиз высокомолекулярных белков. Все остальные эндопептидазы, локализованные в цитоплазме и в плазматической мембране (эндопептидазы 24.11, 24.15, 24.16, пролилэндопептидаза) способны гидролизовать только относительно короткие пептиды, размером, как правило, не более 30-35 аминокислотных остатков [10]. Ниже приведена характеристика некоторых особо важных, и относительно хорошо изученных эндопептидаз нелизосомальной локализации.

**Сигнальные пептидазы** выполняют важные функции в клетке, они участвуют в доставке белков в межмембранное пространство митохондрий, а также играют ключевую роль в секреторном пути, кроме этого удаляют сигнальную часть от препробелков [81].

**Прогормонконвертазы** катализируют гидролиз пептидной связи в различных пропептидах между парами основных аминокислот. Имеются данные о том, что прогормонконвертазы участвуют в образовании предшественников регуляторных пептидов и секретируемых белков [180].

**Кальпаин** относится к металлозависимым тиоловым протеиназам и активизации ему требуется наличие восстанавливающих реагентов. Ограниченный протеолиз специфичных белков кальпаином может быть частью внутриклеточного механизма действия ряда гормонов. К тому же, синаптическая локализация кальпаина и его участие в гидролизе некоторых нейропептидов, позволяет говорить о возможности участия данного фермента в обмене биологически активных пептидов [107]. По чувствительности к ионам кальция выделяют три формы фермента: кальпаин I, кальпаин II, кальпаин III

**Неприлизин** представляет собой транс-мембранный, интегральный белок, функцией которого является катализ расщепления пептидных связей с N-конца остатков гидрофобных аминокислот внутри низкомолекулярных пептидов.

**Эндопептидаза 24.15** является цинк-зависимым металлоферментом, участвует в обмене биологически активных пептидов. Например, образование энкефалинов из коротких предшественников и деградация брадикинина и рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона [177].

**Нейролизин** расщепляет пептидные связи в нейротензине, брадикинине, веществе P, ангиотензинах I и II, люлиберилине, динорфинах 1-7 и 1-8, т.е. может вовлекаться в обмен биологически активных пептидов [153].

**Пролилэндопептидаза.** Ее биологическая роль заключается в гидролизе пептидов, содержащих пролин [108].

**Динорфин-превращающий фермент** представляет собой тиол-зависимую эндопептидазу, которая расщепляет по одиночным остаткам основных аминокислот пропептиды [85]. Предполагают, что роль динорфин-

превращающего фермента в организме заключается в образовании динорфина В-13 [85].

**Прогормон тиоловая протеаза (РТР)** представляет собой тиоловую эндопептидазу, локализованную в секреторных везикулах. Она расщепляет пептидные связи в предшественниках энкефалина ВАМ-22Р, пептидах Е и F по ди- и моноосновным остаткам, с образованием Met-энкефалин [53].

**Мультикаталитический протеиназный комплекс (20 S протеасома)** является АТФ- зависимым ферментом и проявляет активность только по отношению к убиквитированным белкам [208]. Предполагают, что мультикаталитический протеиназный комплекс является начальным этапом деградации большинства цитоплазматических белков [208].

### **Аспартильные протеиназы.**

Аспартильные протеиназы играют исключительно важную роль в самых различных физиологических процессах, таких как пищеварение, процессинг гормонов и регуляторных пептидов, утилизации белков [82]. Предполагается также участие катепсина D в реакциях ограниченного протеолиза [24].

Согласно базе данных MEROPS, созданной Ролингсом и Барреттом, аспартильные протеиназы сгруппированы в 16 различных семейств на основе их аминокислотных последовательностей. В свою очередь, AP собраны в шесть различных кланов, основанных на их эволюционных отношениях и третичной структуре [169]. MEROPS содержит полный список всех последовательностей, имеющих отношение к семейству AP. Большинство APs имеют максимум активности в кислом рН 3– 4, изоэлектрические точки находятся в диапазоне рН 3– 4,5 [54].

Эукариотические аспартильные протеиназы объединяет их главная особенность, они содержат триаду Asp-Thr-Gly вокруг двух аспарагиновых кислот в активном центре (D32 и D215) [98]. Хотя эта характерная черта объединяет, но аспартильные протеиназы разнообразны по многим

параметрам, включая форму активного центра и клеточную локализацию. Эти особенности указывают на их разные физиологические функции [Davies, D.R.], включая внеклеточный гидролиз белков в кислом pH, переваривание внутриклеточных белков и активацию проферментов [82].

Класс аспартильных протеиназ включает семейства эволюционно родственных ферментов – семейство пепсина, к которому относятся не только все пепсины и химозины животных, но и значительно более сложный в структурном отношении катепсин D.

После пепсина катепсин D - вторая наиболее изученная аспарагиновая протеиназа. Физиологические функции катепсин D включают внутриклеточный гидролиз белка, активация некоторых проферментов, регулирование апоптоза, и гидролиз пищевых белков у беспозвоночных [59, 106, 132]. Катепсин D, как известно, функционирует в кислотном диапазоне pH [192]. Его структура может содержать маннозный олигосахарид, связанный в так называемом N-месте полипептидной цепи [192].

Для перехода в активную форму должны произойти некоторые посттрансляционные модификации, сначала в ЭПС удаляются сигнальные последовательности ~20 аминокислот, в результате образуется зимоген. Затем 44 аминокислоты пропептида формируют из зимогена форму промежуточного звена, далее он будет обработан в так называемом регионе обработки и затем преобразован в активную двухцепочечную протеиназу [212].

В катепсине D последовательности аминокислот вокруг активного центра и положение остатков цистеина высоко консервативны [98]. Две петли окружают активный центр и они, вероятно, отвечают за узнавание субстрата. Одна из них, петля полипролина содержит три последовательных пролина, другая петля, “створка Y75” (Tyr75 от нумерации свиного пепсина) гибкая и частично перекрывает активный центр [132]. У млекопитающих, активный cathepsin D- это димерный белок [212], составленной из легкой

полипептидной цепи (14 кДа) и тяжелой (на 31 кДа), которая может быть отделена денатурацией SDS в присутствие восстанавливающего агента [98].

Катепсин D является основной протеиназой лизосом, которая проявляет активность исключительно в кислом диапазоне pH, и преимущественно расщепляет пептидные связи близи гидрофобных аминокислотных остатков [54].

Катепсин D (КФ 3.4.23.5) был впервые описан в 1940 г. Ансоном. В настоящее время фермент выделен из разных источников [54]. Для получения очистки катепсина D применяются такие методы как аффинная хроматография на гемоглобин – сефарозе или пепстатин – сефарозе и т.д. [196, 197].

Катепсин D обычно существует в виде нескольких форм, число которых колеблется до двенадцати. По мнению Танга и соавт., существование различных форм катепсина D может быть обусловлено микрогетерогенностью тяжелой цепи фермента: в положении 228 может занимать как остаток лизина, так и серина, а положение 241- остатки глицина и глутамина; либо микрогетерогенностью олигосахаридов, связанных с остатком Asn-70 [53].

Молекулярная масса катепсина D из разных биологических источников в большинстве колеблется в пределах 44- 50 кДа; фермент встречается в двух формах – одноцепочной (Mr 44-50 кДа) и двухцепочной (Mr 30- 14 кДа или 35-15 кДа) [54, 192]. Расшифрована первичная структура двухцепочечной формы катепсина D из селезенки свиньи: легкая цепь состоит из 97, тяжелая – из 242 аминокислотных остатков [192].

При помощи гель- хроматографии на колонке с сефадексом G-150 экстрактов мозга крыс было идентифицировано две основные формы катепсина D: 45 кДа и 110 кДа [31]. Данные формы имеют различную субклеточную локализацию. Высокомолекулярный предшественник обнаруживается в микросомальной фракции, но катепсин D с молекулярной массой 45 кДа может появляться в цитозоле из-за нарушения целостности

мембраны вторичных лизосом. Ранее, при использовании метода электрофореза в ПААГ, было показано, что молекулярная масса катепсина D из мозга крысы равна 45 кДа[109].

Высокомолекулярный предшественник, обнаруженный в микросомальной фракции, может быть агрегированной формой катепсина D. Однако пик катепсина D молекулярной массой около 110 кДа обнаружен в конечном супернатанте тканей мозга гипотермированных крыс. Этот факт может быть связан как солюбилизацией катепсина D в условиях охлаждения, вследствие нарушения целостности лизосомных мембран, так и активацией изоферментной системы [31].

Еще в 1960 году Е. Пресс и сотрудники сообщили о существовании более десяти форм фермента, выделенных из селезенки быка, максимум активность данных форм фермента наблюдался в интервале рН 5,5-8,4. Гетерогенность кислой протеиназы, расщепляющей гемоглобин была выявлена методами хроматографии на ионообменнике и разделения на колонке с сефадексом G-100, при исследовании фермента из печени крыс [118]. О наличии в животных тканях множества молекулярных форм катепсина D также свидетельствует большой диапазон молекулярных масс фермента, определенных в различных тканях [31, 118].

Наиболее распространенный взгляд на функцию катепсина D в клетке состоит в том, что он является начальным звеном в цепи процессов, ведущих к распаду белков. Фундаментальная роль катепсина D заключается в гидролизе внутриклеточных «отработанных» белков. Предполагается, что катепсин D принимает участие в процессинге антигенов и ферментативной генерации пептидных гормонов. Биологическая значимость протеаз, имеющих эндосомальную локализацию, определяется их участием в распаде ряда специфических белков внутри этих везикул.

#### **1.4. Роль пептидов в регуляции метаболизма насекомых.**

Согласно определению, которое дал Ашмарин, регуляторные пептиды представляют собой высокомолекулярные соединения, состоящие из цепочки аминокислотных остатков, соединенных пептидной связью. Регуляторные пептиды, насчитывающие около двадцати аминокислотных остатков, называют олигопептидами, а от 20 до 100 называются полипептидами, свыше ста аминокислотных остатков – белками. Большинство регуляторных пептидов относится к полипептидам [3].

Классификация пептидов учитывает химическую структуру, физиологические функции и происхождение молекул регуляторных пептидов. При классификации полипептидов встречается ряд трудностей, связанных с их полифункциональностью, поэтому невозможно выделить одну или даже несколько главных функций у каждого пептида. Также встречаются значительные различия в физиологической активности регуляторных пептидов, близких по химической структуре и, наоборот, существуют близкие по функциям, различающиеся по своей химической структуре. Исходя из этого, при классификации регуляторных пептидов учитывают место их образования, поскольку они содержатся и образуются практически во всех тканях и органах [13].

Среди регуляторных пептидов выделяют более 20 семейств. Наиболее изученными являются гипоталамические либерины и статины, опиоидные пептиды, меланотропины, вазопрессины и окситоцины, панкреатические пептиды, холецистокинины, гастрины, тахикинины, нейротензины, кинины, атриопептиды, кальцитонины [13].

Регуляторные пептиды воздействуют практически на все физиологические функции организма, монофункциональные регуляторные пептиды не известны. Некоторые функции организма регулируются несколькими регуляторными пептидами одновременно, однако, для каждого из пептидов характерно качественное своеобразие действия [13, 39].

Помимо прямого действия на различные функции организма регуляторные пептиды оказывают разнообразные и сложные влияния на синтез и созревание тех или иных биорегуляторов и на некоторые метаболические процессы [13, 29].

Все это послужило основой для появления гипотезы о существовании функциональной непрерывности (континуума) системы биорегуляторов в клетке. Такая система обеспечивает, по-видимому, образование сложных регуляторных цепей и каскадов [13, 29]. Все большее внимание исследователей привлекает скорость реакции организма на введение регуляторных пептидов [3, 39].

Широкое применение получили те пептиды, которые известны как гормоны. Например, вазопрессин, АКТГ, соматотропный гормон, инсулин, окситоцин. Важным является изучение противоязвенного и противовоспалительного действия эндорфинов и аналогов энкефалинов, а также их антипсихотического, гипотензивного действия. Большое внимание уделяется изучению иммуностимуляторов – тафцина и его фрагментов, имеются данные о противострессорной активности тафцина и вещества Р [3, 4].

Ключевую роль в регуляции процессов метаболизма клетки регуляторные пептиды играют не только у позвоночных животных, но и у насекомых, особенно в процессах развития. При развитии насекомых происходит синергизм нескольких гормональных систем: пептидных, стероидных и ювенильных. Эти системы контролируют важнейшие личиночные процессы такие как метаморфоз, прохождение диапаузы, пигментацию, меланизацию и поведенческие реакции [21, 38].

Характер взаимодействия гормональных систем разнообразен: антагонистический, синергетический, факультативный и аддитивный. Данный факт зависит от вида насекомых, фазы развития, ткани-мишени и исследуемых ферментативных систем [21, 38].

Согласно современным представлениям, регуляторное действие почти всех гормонов, в том числе и пептидных, в организме животных

осуществляется за счет управления активностью определенных ферментных систем, реализующих в клетках — мишенях специфические физиологические и биохимические эффекты этих сигнальных веществ [21, 38]. Активизация или подавление ферментативной деятельности может происходить за счет их химической модификации, например, фосфорилирование или дефосфорилирование, аденилирование, гликозилирование, изменения проницаемости клеточных мембран, концентрации метаболитов, кофакторов, белок-белкового взаимодействия, а также за счет протеолитической модификации [21, 38]. Независимо от структурных особенностей и молекулярных механизмов действия, регуляторные пептиды могут затрагивать прямо или косвенно генетическое звено регуляции, таким образом, влиять на процессы транскрипции, а затем трансляции [21, 38].

Наиболее многочисленным и вариабельным классом являются пептидные гормоны насекомых, участвующие в контроле постэмбрионального развития, гомеостаза, поведенческих реакций и репродукции [21, 38].

Так, вещество, сходное с инсулином и глюкагоном, получено в экстракте комплекса кардиального тела и прилежащих тел чешуекрылого насекомого *Manduca sexta*. Выявлены нейросекреторные клетки, вырабатывающие инсулин у синей мухи (Diptera). Соматостатин обнаружен в церебральном ганглии асцидии и саранчи. Панкреатический полипептид найден в нервной системе кольчатого червя *Lumbricus terrestris* и гигантской африканской улитки. Вазоактивный интестинальный пептид был обнаружен в подглоточном ганглии и отходящих от него нервов земляного червя. Вещество P, энкефалин и секретин – в ганглиях гигантской африканской улитки [21, 38].

Наличие у млекопитающих системы регуляторных пептидов, образующих так называемый функциональный континуум, позволяет допустить, что подобный уникальный комплекс нейрогуморальной регуляции присущ и насекомым [21, 38]. Так, например, инициирующий

линьку стимул, исходящий обычно из внешней среды и различный у разных видов, вызывает секрецию мозгового гормона, который переносится по аксонам к кардиальному телу, откуда выделяется в гемолимфу. Было установлено, что мозговой гормон – это, по-видимому, полипептид или белок с небольшим молекулярным весом. Мозговой гормон активирует проторакальные железы, в которых, как полагают, образуется гормон линьки, называемый также гормоном роста и дифференцировки, или экдизоном. Экдизон стимулирует процесс линьки, воздействуя на эпидермис [21, 38].

Для осуществления линьки у растущих личинок или нимф выделяется ещё один гормон, секреция которого частично регулируется головным мозгом. Этот гормон, называемый ювенильным, образуется в Corpora Allata; он подавляет дифференцировку имаго, способствуя формированию личиночных стадий. В регуляции развития насекомых участвует гормон диапаузы, выделяемый подглоточным ганглием. Вероятно, этот гормон выделяют нейросекреторные клетки ЦНС [21, 38].

Биологически активные пептиды, служащие посредниками и регуляторами разнообразных функций, оказываются в значительной мере одними и теми же у организмов любой сложности [5]. Большинство классических пептидов присутствуют как у пчел, так и у других насекомых. Например, за мобилизацию энергетических субстратов и стимуляцию иммунной системы отвечает адипокинин, аллатостатин регулирует метаморфоз и угнетает синтез вителлогенина, аллатотропина, наоборот, стимулирует синтез ювенильного гормона, бомбиксин участвует в энергетическом метаболизме углеводов и так далее [156, 166, 195].

Обмен веществ в постэмбриональный период у пчёл подчиняется некоторым общим закономерностям относительно развития других насекомых [162]. После выхода личинки из яйца начинается постэмбриональное развитие, которое сопровождается метаморфозом (превращением). У личинки и куколки происходят интенсивные обменные

процессы, в результате которых накапливаются питательные вещества, необходимые для формирования взрослой пчелы [38].

По данным Штрауса (1911), особенностью обмена веществ у пчел является накопление значительных количеств гликогена в качестве энергетического резерва для процессов метаморфоза. К концу личиночной стадии содержание гликогена уменьшается, а количество жира увеличивается [190].

В первую очередь в организме пчелиных особей расходуется глюкоза, общее содержание глюкозы в личинках рабочих пчел вдвое больше, чем в личинках маток [117]. Когда содержание глюкозы в гемолимфе падает ниже допустимой величины, начинают распадаться и использоваться сложные углеводы. [5].

Необходимо отметить, что активность большинства изучаемых ферментов наивысшая у молодых личинок [148]. Затем она снижается и достигает минимума к стадии куколки. При этом падение активности ферментов у рабочих пчел более существенное, чем у маток. Существует мнение, что в период постэмбрионального развития у маток углеводный обмен носит более аэробный характер, а более высокая активность целой группы ферментов объясняет ускоренные сроки развития маток [148]. Установлены различия также в количестве митохондрий у личинок маток и рабочих пчел, а, следовательно, наблюдаются и различия в некоторых окислительных процессах, протекающих в митохондриях [148].

Следует отметить, что много исследований посвящено изучению газообмена в постэмбриональный период у разных каст медоносных пчел. Полученные данные показали, что количество поглощенного кислорода на одну особь и на единицу массы у различных каст в течение всего постэмбрионального развития изменяется. Потребление кислорода одной личинкой рабочей особи резко возрастает в первые дни личиночной стадии, достигая максимума к моменту запечатывания ячейки, а на стадии предкуколки и куколки снижается, достигая минимума при гистоллизе [187].

У личинок маток потребление кислорода возрастает до запечатывания ячейки [117]. Однако, после запечатывания поглощение кислорода резко уменьшается, данное обстоятельство совпадает с прядением кокона, поглощение кислорода достигает минимума в начальной стадии куколки. Уровень потребления кислорода на единицу массы у маточных личинок по сравнению с личинками рабочих пчел и трутней значительно ниже [117].

Основными источниками энергии у запечатанной личинки и предкуколки служат углеводы, откладывающиеся в виде гликогена, а во второй половине стадии куколки – жиры [79].

Принято считать, что газообмен у медоносных пчел схож с газообменом других насекомых. В процессе развития личинок интенсивность дыхания, выраженная в количестве кислорода, потребляемого на единицу массы, понижается. Однако количество кислорода, потребляемого на одну личинку, увеличивается, достигая максимума перед окукливанием. На стадии куколки газообмен падает, повышаясь к выходу имаго. В то же время наряду со сходством имеются различия в дыхательном обмене трех каст медоносных пчел [148].

### **1.5. Протеолитические ферменты и развитие насекомых.**

Жизненный цикл насекомых включает множество метаболических процессов, контролируемых ферментами, включая протеазы, которые функционируют в определенных тканях и участвуют в таких процессах как пищеварение, развитие и иммунная реакция [174].

Рост и развитие насекомых протекает прерывисто через серию запрограммированных стадий. Этот прогресс отрегулирован уровнем ювенильного гормона и гормона линьки (экдизона). Процессы роста и развития начинаются с эмбриогенеза после оплодотворения яйца. Когда эмбриональное развитие закончено, насекомое появляется из яйца как личинка или нимфа, и продолжает питаться. Незрелое насекомое питается и растет, пока его наружный покров полностью не сформирован. В это время

должна произойти линька и синтезироваться новый защитный покров, чтобы обеспечить дальнейший рост насекомого. После серии личиночных линек животное приступает к метаморфозу: сначала переходит в стадию куколки и, наконец, к стадии имаго. Установлено, что высокий уровень ювенильного гормона поддерживает насекомое в личиночной форме, а уменьшение его уровня запускает процессы метаморфоза, которые приводят, в конечном счете, к формированию репродуктивного взрослого насекомого. Существование такой контролируемой, прерывистой программы роста и развития требует наличия специализированных метаболических процессов в определенные периоды развития насекомого. Многие, возможно все, из этих процессов включают действие специализированных протеаз и пептидаз [131].

В процессе онтогенетического развития организма важные функции выполняет лизосомальная ферментная система. Ферменты лизосом участвуют в процессах гаметогенеза, обновления тканей, расщепления отживших элементов клетки. Основной функцией этих органелл является внутриклеточное пищеварение [118, 168]. Кроме того, роль лизосомального протеолитического аппарата приобретает особенное значение в метаболических реакциях, связанных с преобладанием катаболических реакций, мобилизацией белковых и других ресурсов организма, которые уместно обозначить термином “метаболический стресс”.

В лизосомах обнаруживаются преимущественно цистеиновые и аспартильные пептидазы (исключение составляют только специализированные органеллы гранулоцитов и сперматозоидов). Около 90% активности катепсина D, основной аспартильной эндопептидазы лизосом, обнаруживается в растворимой фракции, 20% ассоциировано с мембранами эндосом [71, 118, 136, 168].

Аспартильные протеиназы (AP), к которым относится исследованный нами катепсин D, широко изучены у млекопитающих, но гораздо хуже у насекомых [118]. Например, у порядка насекомых Hemiptera катепсин D - подобные протеиназы были найдены наряду с цистеиновыми протеиназами.

Было обнаружено, что профиль активности AP связан с гистолизом жирового тела во время раннего метаморфоза *Ceratitis Capitata* [168]. Лизосомальные AP из *Aedes Aegypti* были очищены и охарактеризованы Cho и др. [71]. Две AP- кодирующие ДНК были охарактеризованы из тонкой кишки *Triatoma Infestans*. Также были клонированы AP из *Chilo Suppressalis* с помощью ПЦР метода, и были проанализированы особенности и отличия в его последовательностях в китайской популяции [136].

Исследования протеолитического аппарата лизосом эукариот, различающихся филогенетическим положением (гидра, планария, беззубка, форель, лягушка, курица, крыса), показали, что у организмов ранних ступеней эволюционного развития с преобладающим внутриклеточным типом пищеварения (гидроиды, турбеллярии) протеолитическая активность в лизосомах принадлежит почти исключительно катепсину D, в то время, как на более поздних этапах развития, квота активности катепсина D снижается (в 4-10 раз). Наряду с этим, возрастает уровень активности других пептидаз (катепсинов A, B1 и C) [109].

Увеличение “квоты” протеиназ с более узкой субстратной специфичностью является, по-видимому, отражением участия лизосом в реализации специализированных физиологических функций. Все это говорит об особо важной роли лизосом у организмов со сложным жизненным циклом, претерпевающих в онтогенезе метаморфоз [109].

Метаморфоз - это комплексный, высоко консервативный и строго отрегулированный процесс развития насекомых, сопровождающийся апоптозом устаревших личиночных органов [109].

Возникновение лизосом у насекомых было рассмотрено рядом авторов [142]. Лизосомы были обнаружены в клетках, которые вовлечены в транспорт и деградацию клеточных структур у насекомых, не подвергающихся метаморфозу, и в клетках, которые вовлечены в процесс запрограммированного разрушения структур у насекомых с метаморфозом. Но данные о роли протеаз в процессах метаморфоза оставались неполными.

С течением времени стали появляться сообщения о “катепсиноподобных” кислых протеазах в гомогенате целого насекомого на разных этапах его развития [142].

Рядом авторов было изучено изменение активности кислой протеазы (оптимум pH 3.5-4.1) в гомогенате развивающихся яиц африканской саранчи *Locusta Migratoria Migratorioid*. Фермент ингибировался йодацетамидом, активировался меркаптоэтанолом, и принимал участие в утилизации желточного белка эмбриона. Точно так же кислые протеазы, были обнаружены на стадии яйца у комнатной мухи, *Musca Domestica* [130].

Zh. Gui и др. изучали роль катепсина D в процессах метаморфоза у тутового шелкопряда. Синтез катепсина D у тутового шелкопряда (*VmCathD*) был индуцирован гормоном экдизоном в жировом теле личинки на заключительной личиночной стадии, а также в пищеварительном тракте на стадии куколки, его синтез приводил к апоптозу. Кроме того, высокий уровень *VmCathD* наблюдался в жировом теле личинки *B. Mori*, зараженной бацилловирусом, предполагается, что этот ген вовлечен в индукцию метаморфоза насекомого-хозяина, зараженного бацилловирусом. Вмешательство РНК вируса, индуцировало синтез *VmCathD*, это приводило к отмене апоптоза жирового тела личинки и остановке преобразования личинки к куколке. Основываясь на этих результатах, ученые пришли к заключению, что *VmCathD* вовлечен в апоптоз жирового тела личинки и личиночного пищеварительного тракта в метаморфозе тутового шелкопряда. Продемонстрировано, что потеря функции *VmCathD* разрушает два метаморфических событий у тутового шелкопряда - это переход личинки к куколке и апоптоз личиночного пищеварительного тракта [109].

На основе разнообразия строения и специфичности у млекопитающих катепсины разделены на различные типы. Катепсины А и G подобны протеазам серина; D и E сгруппированы как протеазы аспарагиновой кислоты, тогда как другие, а именно, В, С, F, H, K, L, O, S, V являются цистеиновыми протеазами [204].

Катепсины в онтогенезе насекомого влияют на место, стадию и временные рамки ключевых процессов развития. У насекомых, которые подвергаются полному метаморфозу через четыре стадии жизненного цикла: яйца, личинки, куколки и имаго, основной процесс развития включает катепсинозависимую деградацию желточных белков в эмбриогенезе, таких как вителлин, вителлиноген. У тутового шелкопряда эту функцию выполняет катепсин L, в то время как у *Helicoverpa armigera* и *Antheraea pernyi* за это отвечает катепсин В. Синтез и активность катепсина В подвергается постепенной редукции по мере развития эмбриона и прекращается при выходе личинки из яйца [218].

После выхода из яйца и до шестой личиночной стадии насекомое подвергается линьке, синтезируя новый экзоскелет и сбрасывая старую кутикулу [102]. Кроме того, особо важна во время линьки и метаморфоза реконструкция таких личиночных тканей, как жировое тело и гемолимфа. Катепсины признаны ключевыми регуляторами в этих процессах, что подтверждается в колебании их активности во время линьки и периодов между линьками [130].

У *H. Armigera* содержание катепсина L (Har-CL) максимально во время линьки и на стадии предкуколки, в то время как наименьшая активность наблюдается в питающиеся периоды, здесь выходит на первый план его роль в деградации кутикулы и слоя эпидермиса во время линьки [201, 202].

Har-CL прежде всего активен в жировом теле личинок и на ранних стадиях куколки, где он выходит из лизосом во внеклеточный матрикс. Это отражает его роль в протеолитической деградации клеток жирового тела в гемолимфе, где низкая активность Har-CL компенсируется несвязанной формой катепсина L (HaCathL) в гранулоцитах [201, 202].

HaCathL ответственен за преобразование гранулоцитов в макрогранулоциты во время метаморфоза. Кроме того, различные функциональные исследования предполагают участие и других катепсинов, кроме катепсина L, в линьке и метаморфозе.

В средней кишке *Chilo Suppressalis* и *B. Mori* наряду с катепсином L идентифицирован катепсин F, а в гемолимфе катепсин O. Кроме того, катепсин B обнаружен в гранулоцитах и плазмацитах личинки на стадии предкуколки *H. Armigera*, что указывает на его роль в переходе к куколке [70, 109]. Кроме того, в период формирования куколки у *B. Mori* катепсин B активен наряду с катепсином L в шелковой железе и в жировом теле.

После формирования куколок жировое тело и средняя кишка личинок подвергаются деградации, чтобы сформировать тело имаго. В *B. mori*, катепсин аспарагиновой кислоты катепсин D (*BmCath D*) обнаружен в жировом теле личинок, он принимает участие в формировании куколок наряду с катепсином B. Одновременно, синтез катепсина B сильно выражен в средней кишке личинок, и сохраняется в куколке до выхода имаго. Однако, в *H. Armigera* только катепсин B вовлечен в метаморфоз от куколки к имаго. Активность катепсина B в жировом теле имаго может указывать на его участие в процессах старения, когда жировое тело имаго деградирует [178, 201, 202].

Таким образом, определенная пространственная и стадийная активность катепсинов проливает свет на тот факт, что для поддержания жизненного цикла насекомых есть определенный баланс различных катепсинов. Деятельность этих ферментов контролируется на уровне транскрипции и трансляции. Активность этих ферментов изменяется в ответ на такие физиологические факторы, как гормоны. Взаимодействие таких гормонов, как экдистероиды и ювенильный гормон (JHs), играют важную роль в развитии и метаморфозе насекомого [174].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материал исследования

Объектом исследования были выбраны личинки трутней и рабочих пчел, которые, характеризуются чрезвычайно высокой скоростью роста и обменных процессов. За очень короткий период развития (6 -7 дней) масса личинки увеличивается более чем в 1500 раз [6, 7]. В основе этого процесса лежат уникальные механизмы регуляции генетического аппарата, контролирующего скорость синтеза белка в клетке, в том числе ферментов, что обеспечивается высоким уровнем сбалансированного содержания питательных веществ. Расплод пчел не зря называют «банк биологически активных веществ» [6, 7].

Для исследований использовались личинки трутневого расплода 1, 2, 3, 4-5, и 6-7- суточного возраста и личинки рабочей пчелы 1, 2, 3, 4 и 5-6 суточного возраста. Личинки извлекали из сот, взвешивали на аналитических весах для определения их возраста по морфологическим показателям, затем промывали дистиллированной водой для удаления следов корма и замораживали. Все операции производились на холоде.

Масса односуточных личинок (4 день от момента закладки яйца) =  $20 \pm 0,5$  мг- трутни,  $20 \pm 0,5$  мг - рабочие пчелы; масса двухсуточных личинок (5 день от момента закладки яйца) =  $70 \pm 2$  мг - трутни,  $40 \pm 1,2$  мг - рабочие пчелы; трехсуточных личинок (6 день от момента закладки яйца) =  $90 \pm 3$  мг - трутни,  $60 \pm 1,8$  мг - рабочие пчелы; четырехсуточных личинок рабочих пчел  $80 \pm 1,2$  мг, четырех - пятисуточных личинок трутней (7-8 день от момента закладки яйца) = 120-280 мг; пяти- шестисуточных личинок рабочих пчел 100-120 мг, шести-семисуточных личинок трутней(9-10 день от момента закладки яйца) = 310-360 мг.

Исследование количественного и качественного состава белков, пептидов и активность протеолитических ферментов проводили во всех пяти возрастах личинок.

## **2.2. Получение препаратов растворимых белков из личинок.**

Исследование количественного и качественного состава белков и активность протеолитических ферментов проводили в 10%-ных экстрактах личинок: 1 г личинок гомогенизировали в 10 мл 0,9% NaCl, затем, на рефрижераторной центрифуге в течение 30 минут при 10000 об/мин отделяли оставшиеся неразрушенные клетки и субклеточные структуры, сливали супернатант и в нем определяли количественное содержание белка по стандартной методике Лоури [144], а также активность ферментов. Все операции по составлению инкубационной смеси проводили в ледяной бане при температуре 5-7° С, экстракт хранили в камере глубокой заморозки при -40°С [11, 13].

Для определения количественного содержания пептидов, готовили экстракты пептидов. Их получали путем осаждения белков из исходных 10% водных экстрактов с помощью 5 минутного кипячения с последующим центрифугированием 4000 об /мин 20 минут. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость использовали как источник пептидов [11, 12]. Концентрацию белков и пептидов в полученном экстракте определяли по методу Лоури [144].

## **2.3. Определение активности протеолитических ферментов в экстракте личинок.**

Для проведения опытов по изучению активности **катепсина D** использовали модифицированную методику. В инкубационную среду, содержащую 120 мкл 100 мМ натрий - ацетатного буфера (pH=4,5) добавляли 40 мкл 10% экстракта трутневых личинок, 40 мкл 8% гемоглобина, перемешивали и на 40 минут помещали в водяной термостат на инкубацию при температуре 37°С. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 5% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Пробы центрифугировали 20

минут при 4000 об/мин, отбирали 100 мкл супернатанта на проведение цветной реакции. Количество продуктов гидролиза гемоглобина определяли по методу Лоури [144]. Из полученных величин оптических плотностей опытных проб вычитали величины оптических плотностей соответствующих контрольных проб, которые отличались от опытных проб тем, что ТХУ в них вносили перед добавлением субстрата [12].

При определении **трипсиноподобной активности** использовали метод Ансона (Anson M., 1938) с некоторыми модификациями. Реакцию начинали прибавлением 0,5 мл БАПНА к инкубационной среде, содержащей 300 мкл 0,05 М фосфатного буфера (рН=10) и 250 мкл гомогената личинок, после 30 минут инкубации при 37° С реакцию останавливали добавлением 350 мкл 1 н. НСl. В контрольные пробы кислота вносилась перед субстратом. Количество образовавшегося п-нитроанилина определяли спектрофотометрически при длине волны 383 нм [12].

За единицу активности ферментов принимали такое их количество, которое катализирует высвобождение 1 мкмоля продукта реакции (п-нитроанилина для трипсиноподобного фермента и тирозина для катепсина D) за 1 мин на 1 мг белка. Количество выделившегося п-нитроанилина и тирозина определяли по калибровочной кривой.

Из литературных данных известно, что рН оптимум данных ферментов у насекомых отличается от аналогичных ферментов у позвоночных животных [9,12,15,19,43,104]. Ввиду этого предварительно нами был проведен кинетический анализ: подбор оптимума рН действия ферментов, концентрации субстрата, времени инкубации, а также ингибиторный анализ с применением специфических ингибиторов протеаз: пепстатин для катепсина D, ингибитор Кунитца для трипсиноподобного фермента. Концентрация ингибиторов составляла 0,001 М. Для оценки влияния ингибиторов, вычисляли долю (% от контроля) остаточной активности ферментов в присутствии данного эффектора.

Для подбора оптимального значения рН действия ферментов, активность катепсина D определяли в диапазоне рН 3,0-5,0, активность трипсиноподобного фермента в диапазоне рН 7,0-10,0.

#### **2.4. Электрофоретическое фракционирование растворимых белков личинок.**

Для оценки качественного содержания белков на разных стадиях развития личинок проводили электрофоретическое фракционирование растворимых белков в 7,5% ПААГ – блоке. В ячейку геля наносили до 400 мкг белка в объеме 40 мкл [144]. Электрофорез проводили в 0,025 М трис-глициновом буфере рН 8,3 при напряжении 120В и силе тока 25 мА до вхождения образцов в гель и при напряжении 180В и силе тока 50 мА после вхождения образцов в гель. В качестве лидирующего красителя использовали бромфеноловый синий. После достижения фронта красителя 4/5 пластины геля, электрофорез прекращали.

Для идентификации белковых зон по завершении электрофореза пластинку геля помещали на 30 минут в фиксирующий раствор (125 мл изопропанола, 50 мл уксусной кислоты, 325 мл воды, 1,25 г Кумасси R-250). Отмывку геля от красителя осуществляли в течение суток смесью уксусная кислота – этанол - вода в соотношении 10-1-30 [36].

Для определения расстояния, пройденного белками за время электрофоретического разделения, вычисляли расстояние от линии старта до середины каждой окрашенной белковой зоны. Подвижность белка (Rf) рассчитывали по формуле:

$$Rf = S/L$$

где S- расстояние, пройденное белком, см; L- расстояние, пройденное красителем, см; L<sub>1</sub>- длина геля перед окрашиванием, см; L<sub>2</sub>- длина геля после отмывки, см. [36].

## **2.5. Разделение белков и пептидов личинок методом гель – фильтрации.**

Для исследования качественного состава пептидов проводили разделение белковой и пептидной фракции в исходных прокипяченных экстрактах методом геля - фильтрации, на колонке 35\*1,5 см, заполненной сефадексом G-25. На колонку, предварительно уравновешенную раствором 0,9% NaCl, наносили 500±50 мкл раствора белка (экстрактов личинок каждой стадии развития) с концентрацией 4 мг/ мл. Скорость элюции белков с колонки составила 30 мл/час, собирали 30 проб по 2 мл. Параметры колонки (внутренний и свободный объем) определяли по голубому декстрану и рибофлавины. Концентрацию элюирующихся белков и пептидов измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм [35].

## **2.6. Высокоэффективная жидкостная хроматография фракции пептидов личинок трутней и рабочих пчел.**

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии применяется для тонкого разделения смесей биополимеров и других соединений. Он является вариантом колоночной жидкостной хроматографии, в которой подвижная фаза – элюент - проходит через колонку, заполненную сорбентом, с большей скоростью за счет значительного давления (десятки и сотни атмосфер) на входе в хроматографическую колонку.

Полученную фракцию пептидов молекулярной массой до 5 кДа анализировали с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Предварительно фракцию пептидов делипидизировали с помощью раствора гексана и этилацетата. В качестве сорбента использовали силикогель. Хроматографию проводили на хроматографических системах NGC Chromatography System BIO RAD. Колонку фирменного изготовления, заполненную носителем силикагель «Vydak C-18» (250 x 3,9 мм) с размером частиц 5 мкм, уравновешивали 0,1 %

трифторуксусной кислотой. Затем с помощью инжектора проводили нанесение делипидизированного образца, подлежащего фракционированию в объеме 50 мкл. Наносимый образец содержал 200-300 мкг белка (концентрацию белков и пептидов определяли спектрофотометрически при 280 нм). После завершения нанесения образца осуществляли элюцию белков градиентом 50% ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте. Скорость нанесения образца на колонку 0,3 мл/мин, общее время анализа составляло 60 мин, время прохождения раствора каждой концентрации было одинаковым. Для детекции пептидного состава использовали длины волн 216, 226, 250, 280 нм. Калибровку колонки осуществляли с помощью пептидов с разными молекулярными массами – окситоцин (1 кДа),  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи инсулина (2,5 и 3,5 кДа), а также рибофлавин (6 кДа) [1, 40].

## **2.7. Физиолого-фармакологические тесты для определения физиологических эффектов фракции пептидов, полученных из личинок трутней.**

Для изучения физиологических эффектов, которые возникают у лабораторных животных при введении им фракции пептидов молекулярной массой до 5 кДа, полученных из личинок трутневого расплода, были выбраны две методики: «Выработка условного пищедобывательного рефлекса» и «Открытое поле» [11, 28].

В качестве лабораторных животных использовались белые беспородные трехмесячные самцы крыс массой 190–220 грамм. Животных содержали в условиях вивария при искусственном освещении (СТ 12:12) со свободным доступом к воде и пище. Для выполнения экспериментов они были поделены на две группы: опытная – с интраназальным введением 20 мкл фракции пептидов за 15 минут до начала эксперимента; контрольная – с интраназальным введением 20 мкл 0,9 % NaCl за 15 минут до начала эксперимента [11, 28].

Тест «Открытое поле» используется для изучения поведения животных в новых условиях окружающей среды, что само собой для них является стрессом. Данный тест служит экспериментальной моделью тревоги и широко используется для оценки анксиолитического (уменьшающего стресс) эффекта фармакологических препаратов [33]. Установка, используемая в тесте «Открытое поле», представляет собой круглую площадку с высокими бортами (диаметр (d) площадки для крыс – 97 см, высота бортов- 40–60 см). Площадка разделена на 18 секторов нарисованными линиями, на них имеется 16 отверстий диаметром 2–3 см [33]. После введения фракции пептидов крыс помещали в центр площадки и фиксировали с помощью видеоборудования следующие параметры в течение 5 минут: горизонтальная и вертикальная двигательная активность (ГДА и ВДА), количество заходов в центральную зону, обнюхивание отверстий, наличие реакций замирания (отчаяния или «freezing»), дефекацию и груминг. С помощью этих показателей оценивается уровень стресса, которое испытывает животное в новых условиях [33].

Для изучения ноотропного эффекта (стимуляция умственных процессов) фракции пептидов из личинок трутней использовался тест «Выработка условного пищедобывательного рефлекса». Установка для данного теста представляет собой Т-образный лабиринт, в одном из рукавов которого находился корм (кусочки хлеба массой 0,2 грамма). Лабораторных крыс с пищевой депривацией помещали в стартовый отсек, после чего через 30–60 секунд открывали дверцу из стартового отсека в лабиринт, при этом раздавался звуковой сигнал, который служил условным раздражителем. В качестве критериев выработки рефлекса выбирали восемь правильных пробежек из десяти предъявляемых. В данном тесте регистрировали время пробежки животного от стартового отсека до кормушки, а также число правильных и неправильных ответов (заходы в пустой рукав) [86]. Эксперименты проводили в течение 5 дней, за данный промежуток времени у крыс на звуковой раздражитель вырабатывался пищевой условный рефлекс.

Перед проведением экспериментов животных адаптировали к лабиринту: за день до эксперимента их помещали в установку Т-лабиринта [27, 28].

## **2.8. Статистическая обработка результатов эксперимента.**

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. Сравнение средних значений показателей проводили по t-критерию Стьюдента. Для оценки достоверности двух выборок использовали U-критерий Уилкинсона (непараметрический критерий Манна – Уитни). Исследование значимости различий средних значений в пределах одной серии параллельных измерений рассчитывали методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), с использованием F-критерия, с уровнем достоверности  $p < 0,05$ . Для выявления взаимосвязи между изучаемыми параметрами использовали корреляционный анализ [22].

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Несмотря на то, что пчелы рассматриваются в качестве важнейшего модельного организма для понимания социального поведения насекомых, на молекулярном уровне в области биологии развития, нейробиологии, генетики, иммунологии они оставались в значительной степени неисследованными. Эта ситуация колоссально изменилась после окончания расшифровки генома *A. MELLIFERA* в 2006 году [214].

Во время личиночной стадии, пчелы растут в геометрической прогрессии, женские пчелы дифференцируются в королев и рабочих пчел в ответ на их рацион питания [45]. Самым поразительным в личиночной стадии является то, что вес медоносной пчелы увеличивается приблизительно 1500 раз в течение всего 6 дней [68].

Но, изучению физиологически активных пептидов пчел уделяется незначительное внимание (за исключением антимикробных пептидов), хотя уже в течение многих лет все больше исследователей привлекает изучение пептидов. Это неудивительно, ведь пептиды участвуют в регуляции обмена веществ и различных процессов клеточной активности животных, к тому же одной из перспективных групп фармакологических препаратов являются препараты на основе пептидов, полученных из биологических объектов [11, 12, 13, 22, 23].

В генезе и деградации белков и регуляторных пептидов принимает участие большое разнообразие протеолитических ферментов, которые и задают направление перестройки метаболизма, обеспечивая, тем самым, контроль не только белкового обмена во времени и пространстве, но и обмен веществ в целом [10, 13]. Таким образом, активность протеолитических ферментов важный фактор в регуляции обмена веществ. Другими словами, протеолиз (ферментативный гидролиз пептидных связей в белках и пептидах) – один из универсальных процессов живой природы. Он играет

важную роль в поддержании стационарных концентраций белков и пептидов в живой клетке на определенном этапе развития организма [10, 13].

### 3. 1. Количественное содержание белков и пептидов в личинках трутней и рабочих пчел на разных стадиях развития.

Судя по полученным данным о количественном содержании белков и пептидов в онтогенезе трутневых личинок и личинок рабочих пчел, можно отметить, что максимальное количество пептидов наблюдается в первые двое суток развития личинок.

Обнаруженный нами факт, возможно, указывает на то, что наиболее интенсивный обмен регуляторных пептидов наблюдается именно на начальных этапах. Динамика содержания пептидов у личинок трутней и рабочих пчел, начиная с четвертых суток, несколько отличается: у трутней, начиная со вторых суток и по седьмые, количество пептидов убывает, а у личинок рабочих пчел на седьмые сутки наблюдается увеличение содержания пептидов. Этот факт может говорить об интенсификации внутриклеточных процессов, в которых принимают участие регуляторные пептиды на заключительном этапе развития личинки.

Результаты исследования количественного содержания белка в личинках трутней и рабочих пчел на разных стадиях развития показаны на рисунке 1.

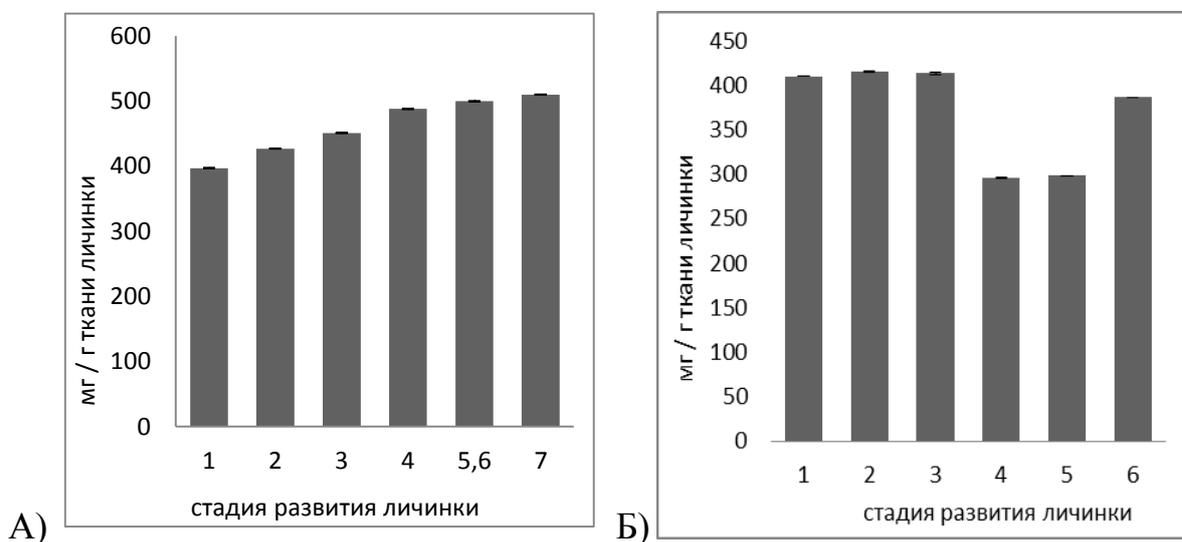


Рисунок 1. Содержание белка в мг в 1 г личинок разных возрастов.

А) Трутневый расплод. Б) Рабочие пчелы. ( $M \pm m$ ,  $n=6$ ),  $p < 0,05$ .

Из рисунка 1 видно, что у личинок рабочей пчелы, динамика содержания белков отличается от таковой у личинок трутней. Содержание белка в личинках трутней увеличивается с возрастом (рис. 1А). Содержание белков в личинках рабочих пчел имеет иной характер (рис. 1Б). В течение первых трех суток развития личинки содержание белков практически одинаково (410-415 мг), на 4-6 сутки развития личинки, наблюдается уменьшение содержания белков (296-298 мг/ г личинки), а к заключительной стадии развития - резкое увеличение до 386 мг/ г личинки. Полученные данные свидетельствуют о различном уровне экспрессии белков на стадии кормления тех и иных личинок маточным молочком (1-3 суток). Так, личинка рабочей пчелы, в отличие от личинки трутней, характеризуется более высокой скоростью биосинтеза белков [117].

В дальнейшем, на четвертые и последующие сутки (время начала основного морфогенеза), картина меняется в противоположную сторону. Биосинтез белков начинает превалировать у личинок трутней. Подобное различие в изменении содержания белков в онтогенезе трутней и рабочих пчел является следствием того факта, что у трутней начинается морфогенез раньше, чем у рабочих пчел, и синтезируется больше белков цитоскелета, которые обеспечивают формирование больших размеров тела трутней [92].

Результаты исследований по содержанию пептидов в личинках трутней и рабочих пчел на разных стадиях развития представлены на рисунке 2.

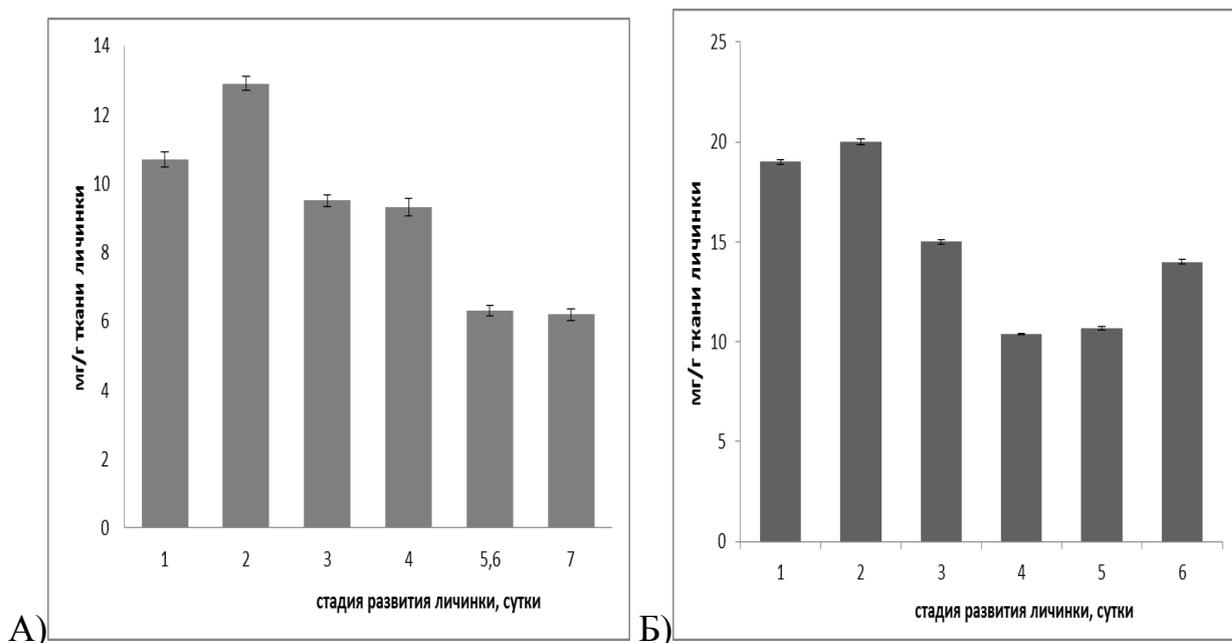


Рисунок 2. Содержание пептидов в мг на 1 г ткани личинок разных возрастов. А) Личинки трутневого расплода. Б) Личинки расплода рабочих пчел. ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ),  $p < 0,05$ .

Количественное содержание пептидов по мере развития личинок уменьшается (рис. 2). Наибольшее содержание пептидов обнаружено на 1-3 сутки развития личинок, на данном этапе личинки вскармливаются маточным молочком. Данный вид корма личинок в первые трое суток богат аминокислотами и пептидами [183].

В личинках трутней, начиная с четвертых суток, с увеличением возраста наблюдается уменьшение содержания пептидов (рис. 2А), а в личинках рабочих пчел на заключительном этапе развития (6 сутки), напротив, наблюдается небольшое увеличение содержания пептидов (рис. 2Б). Обнаруженная закономерность может объясняться генетическими особенностями рабочих пчел: на заключительном этапе личиночной стадии происходит активизация синтеза белков углеводного обмена и белков-антиоксидантов, а также инсулин-подобных пептидов, играющих важную роль в процессах усиленного апоптоза яйцевых трубок [126, 128].

Для более полного понимания характера выявленной динамики содержания пептидов в онтогенезе личинок трутней и рабочих пчел

первичный экспериментальный материал был подвергнут дисперсионному анализу влияния возраста личинки на содержание пептидов (рис.3).

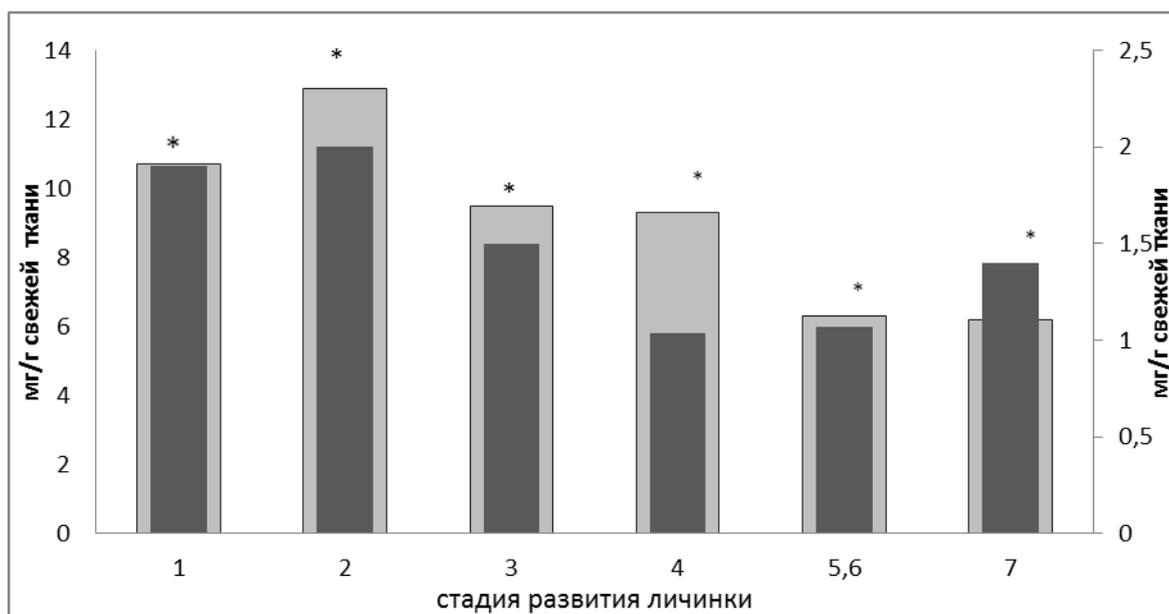


Рисунок 3. Дисперсионный анализ динамики содержания пептидов в онтогенезе личинок. ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ). \*-  $p < 0,05$  относительно предыдущего значения. ■ – личинки трутней, ■ - личинки рабочих пчел.

Статистически значимая динамика ( $p < 0,05$ ) содержания пептидов в онтогенезе личинок трутней и рабочих пчел наблюдается на протяжении всего онтогенеза личинок.

Дисперсионный анализ влияния возраста личинки на содержания пептидов в онтогенезе личинок трутней и рабочих пчел показал достоверную зависимость содержания пептидов от стадии развития личинки.

### **3.2. Разнообразие белков в личинках трутней и рабочих пчел на разных стадиях развития.**

В нашей работе методом электрофореза в нативных условиях показана динамика белков в ходе развития личинок трутней и рабочих пчел. Обнаружено отличие в распределении белков по зонам на начальных этапах онтогенеза личинок трутней и рабочих пчел (рис. 4).

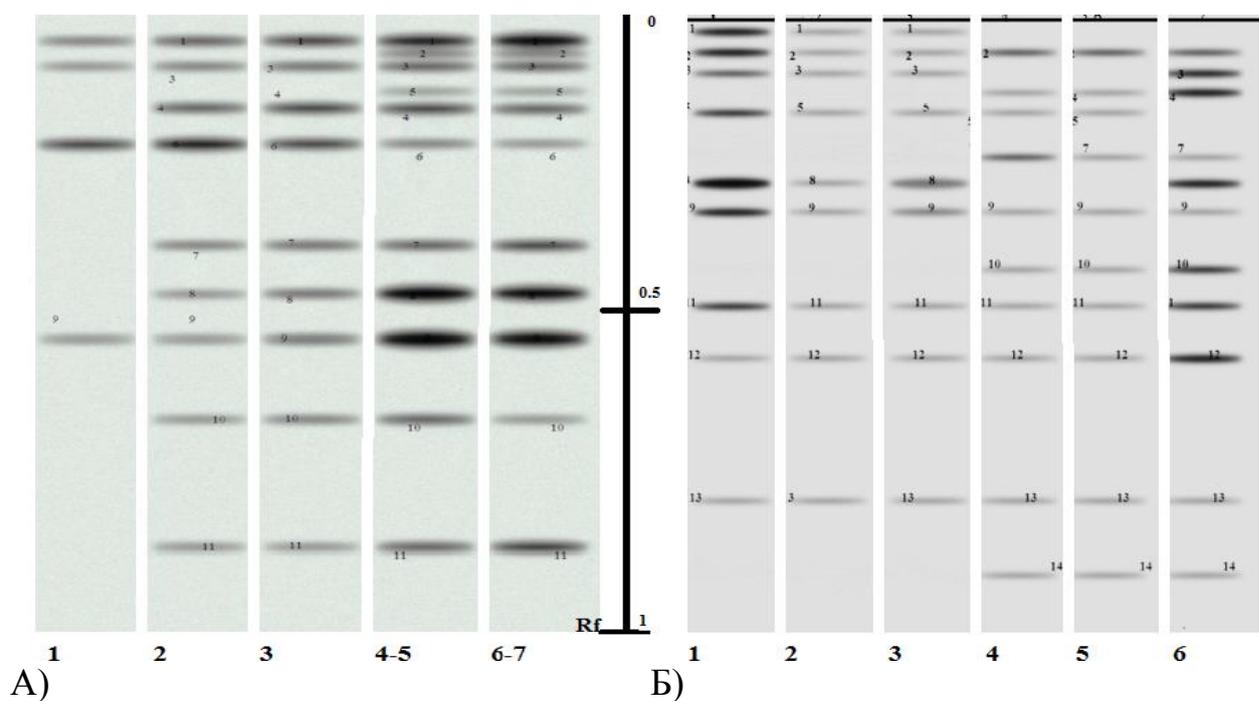


Рисунок 4. Электрофоретическое разделение водорастворимых белков А) Личинки трутней 1,2,3,4-5,6-7 суточного возраста. Б) Личинки рабочих пчел 1,2,3,4, 5,6- суточного возраста.

При электрофоретическом разделении белков из водного экстракта личинок трутневого расплода разного возраста идентифицировано от 4 до 11 фракций (рис. 4А). Количество белковых зон со сходными значениями Rf были отражены в работе других авторов [22, 123]. Основное количество белка распределено по двум группам: глобулиновая группа (фракции-4, 5, 6) и альбуминовая группа (фракции-7, 8, 9). С возрастом личинки отмечается увеличение количества белков с малыми значениями Rf, значительная часть которых остается на старте, образуя зону №1, а также появление двух новых белковых зон (№2, 5) у 4-5 и 6-7 суточных личинок. Кроме основных белковых фракций можно также идентифицировать минорные фракции в диапазоне Rf 0,3-0,5 и 0,7-0,9, которые не всегда удается идентифицировать при данном способе окрашивания.

Характер распределения белков по зонам у личинок рабочих пчел несколько отличается от распределения белков у личинок трутней (рис. 4Б). При электрофоретическом разделении белков водных экстрактов личинок

рабочих пчел идентифицировано от 9 до 11 фракций. Основное количество белка распределено по двум группам: глобулиновая группа (фракции-3,4,5) и альбуминовая группа (фракции-10,11,12). В первые трое суток развития личинки рабочей пчелы наблюдается схожее распределение белковых зон- 9 фракций. Наблюдается высокомолекулярная белковая зона №1, которая не идентифицирована у других возрастов. Появление данной белковой зоны может быть связано с кормлением личинок рабочих пчел в первые трое суток маточным молочком [22, 123].

У четырехсуточных личинок наблюдается отличие распределения белков по зонам от более раннего возраста и насчитывается 11 фракций. С возрастом личинки отмечается увеличение количества белков с малыми значениями Rf, значительная часть которых остается на старте, образуя зону №2, а также у 4 и 5 и 6-суточных личинок появляются новые белковые зоны (№4, 7, 10, 14). Кроме основных белковых фракций можно также идентифицировать минорные фракции в диапазоне Rf 0,3-0,5 и 0,7-0,9, которые не всегда удается идентифицировать при данном способе окрашивания.

У односуточных личинок трутней идентифицировано всего четыре белковые зоны (первый трек на рис. 4А), в то время как у личинок рабочих пчел того же возраста идентифицировано 9 белковых зон (первый трек на рис. 4Б). Такое различие в количестве белковых зон, а, следовательно, в разнообразии белков может быть следствием двух разных путей развития трутней и рабочих пчел: из неоплодотворённых и оплодотворенных яйцеклеток.

Картина распределения белков по зонам на более поздних этапах развития личинок трутней и рабочих пчел приобретает аналогичный вид и насчитывает 11 белковых фракций (4-5, 6-7 трек на рис. 4А и 7 трек на рис. 4Б). На заключительных этапах развития личинок обеих каст их питание приобретает схожий состав, что может обуславливать экспрессию белков, участвующих в схожих внутриклеточных дифференцировках [126, 128].

Увеличение разнообразия белков на поздних этапах развития личинок может быть связано с началом специализации клеточных структур, участвующих в закладке органов и тканей [68].

### 3.3. Исследование пептидной фракции в личинках трутней и рабочих пчел методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для получения пептидной фракции производили разделение высокомолекулярных белков и низкомолекулярных пептидов в личинках трутней (рис. 5А) и рабочих пчел (рис. 5Б) методом **гель-фильтрации на сефадексе G-25**. Методом гель-фильтрации были разделены белки и пептиды исходного экстракта личинок, а также белки и пептиды, полученные после денатурации и осаждения белков в исходном 10% -ном водном экстракте с помощью кипячения. На рис. 5 показан профиль элюции двухсуточных личинок. Подобный профиль разделения белков и пептидов характерен для всех возрастов личинок.

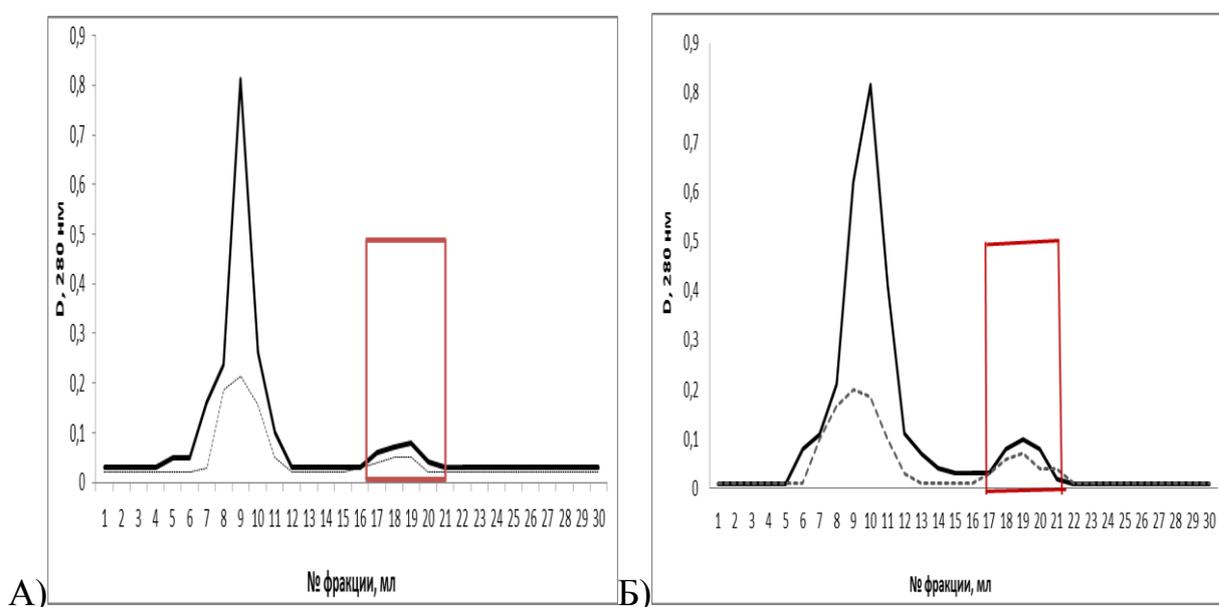


Рисунок 5. Профили элюции белка исходного 10%-ного экстракта личинок (1) и экстрактов личинок, полученных после кипячения (2). А) Личинки трутневого расплода. Б) Личинки рабочих пчел на разных стадиях развития.

При разделении белков исходного экстракта двухсуточных личинок (рис. 5) получено две основные фракции (два пика). Согласно характеристикам сефадекса G-25 (Шапиро Д.К., 1976), высокомолекулярные белки выходят в свободном объеме колонки (7-11 мл), за свободным объемом выходят низкомолекулярные белки и пептиды молекулярной массой до 5 кДа (17-21 мл). Нами было ранее показано, что, именно пептидная фракция до 5 кДа обладает выраженными физиологическими эффектами [11, 27, 28]. В связи с этим, именно фракция пептидов до 5 кДа и послужила предметом наших дальнейших исследований.

На рисунке 5А и 5Б пунктиром изображены профили элюции экстрактов пептидов, полученных после осаждения белков кипячением. Данный прием был использован с целью получения пептидов. К тому же процесс кипячения предотвращает действие протеолитических ферментов, присутствующих в среде, и этим максимально достигается получение нативных пептидов, характерных для живого организма.

Изучение методом ВЭЖХ спектра пептидной фракции молекулярной массой до 5 кДа, которая была получена с помощью гель – фильтрации исходного экстракта после кипячения, позволило установить некоторые изменения в спектре пептидов по мере развития личинок (рис. 6).

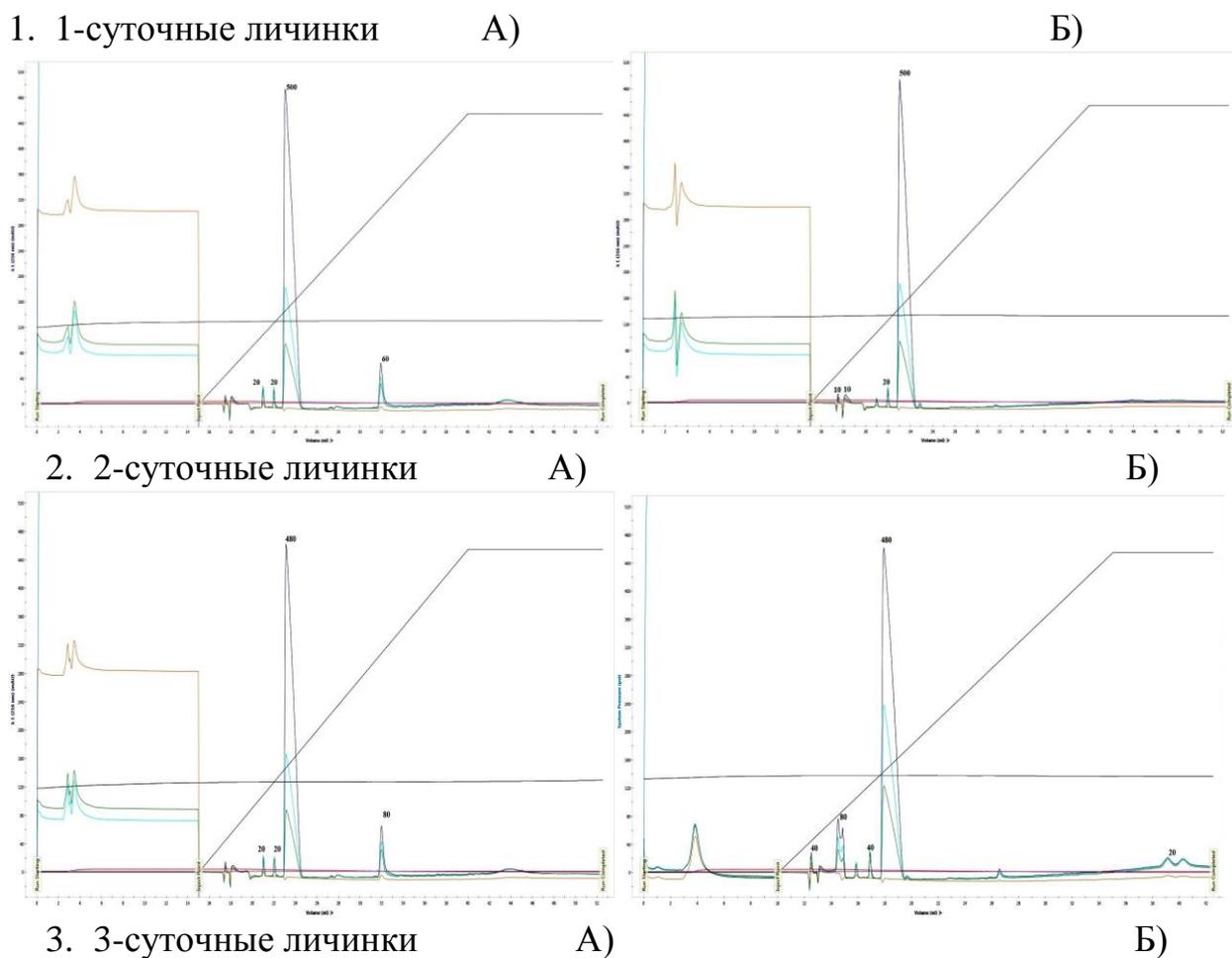
Установлено, что с возрастом личинок увеличивается количество пептидных пиков, в то время как общее содержание пептидов уменьшается. Наибольшая концентрация пептидов наблюдается во фракциях на первые-вторые сутки развития личинок (табл. 1). Данные по количественному распределению пептидов в хроматографических пиках после ВЭЖХ, определенные с помощью программы ChromLab, коррелируют с количественным содержанием пептидов, определяемых другими методами.

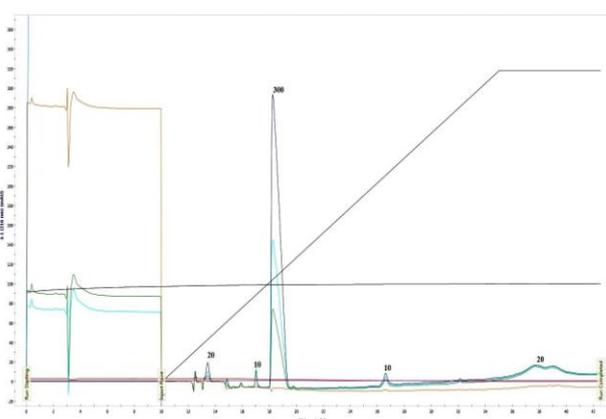
Таблица 1. Суммарная концентрация пептидов личинок трутневого расплода и рабочих пчел ( $M \pm m$ ,  $n=3$ ).

Суммарная концентрация пептидов в пиках (усл.ед.)						
	1-суточные	2-суточные	3-суточные	4-суточные	5-6 суточные	7-суточные
личинки трутней	5707±0,02	5025±0,03	2362±0,05	2837±0,01	441±0,01	390±0,03
	1-суточные	2-суточные	3-суточные	4-суточные	5-суточные	6-суточные
личинки рабочих пчел	4561±0,07	4531±0,05	4016±0,02	521±0,01	546±0,01	3805±0,07

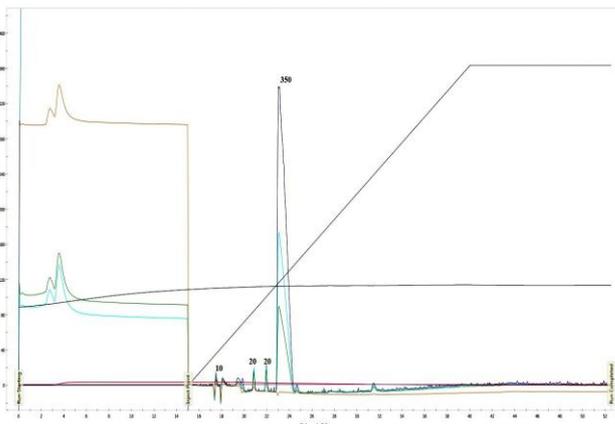
Примечание: концентрация пептидов в пиках после ВЭЖХ определена с помощью программы ChromLab.

На рисунке 6 представлены разделения пептидной фракции (до 5 кДа) личинок трутней (рис. 6А) и рабочих пчел (рис. 6Б) на разных стадиях развития. Измерение проводилось в 3 технических повторах.

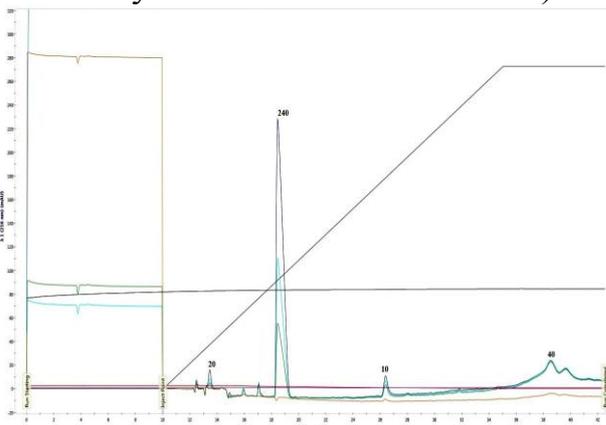




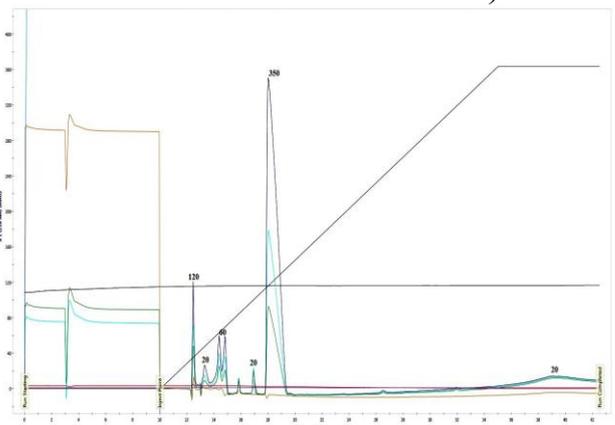
4. 4-суточные личинки А)



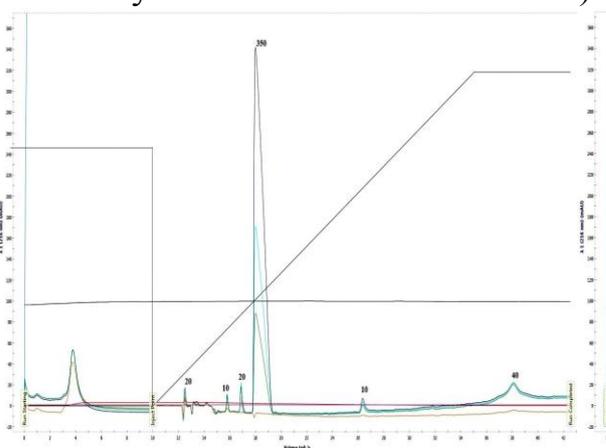
Б)



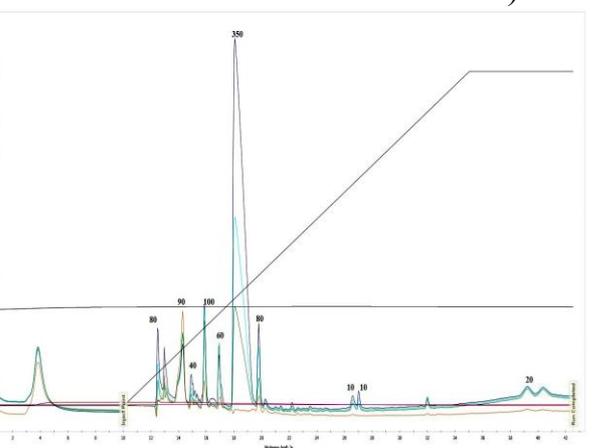
5. 5-суточные личинки А)



Б)



6. 6- и 7-суточные личинки А)



Б)

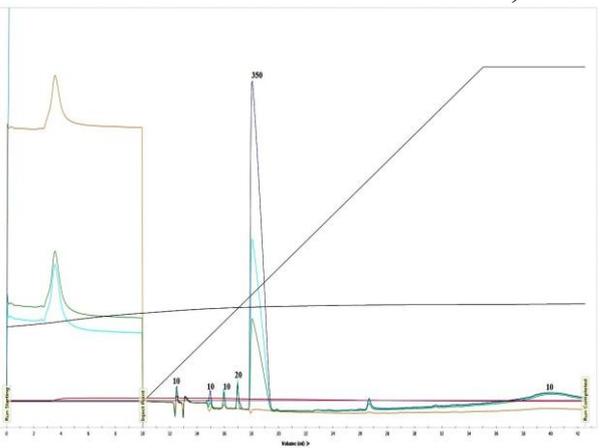
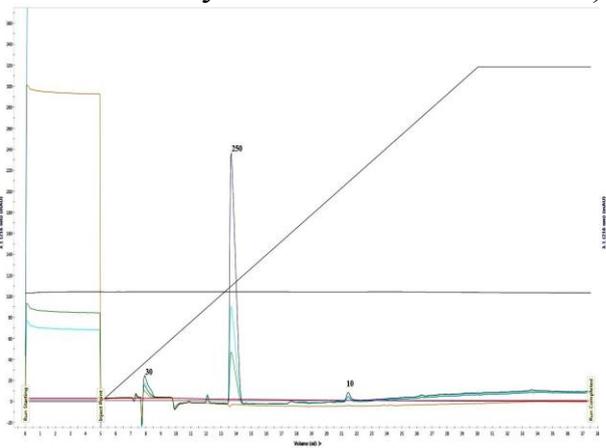


Рисунок 6. Разделение пептидов личинок разного возраста методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. А) Личинки трутней. Б) Личинки рабочих пчел. По оси ординат - экстинкция, мл; по оси абсцисс - степень поглощения при разных длинах волн:

●  $\lambda$  1 (216 nm) ●  $\lambda$  2 (226 nm) ●  $\lambda$  3 (250 nm)

В составе низкомолекулярных пептидов (до 5 кДа) 1-суточных личинок трутневого расплода (рис. 6А) обнаружено 4 пептидные фракции с интенсивностью поглощения 500 mAU при длине волны 216 нм. У 2-суточных трутневых личинок характер распределения пептидных фракций аналогичен распределению пептидов 1-суточных личинок, но максимум интенсивности поглощения составляет 400 mAU. У 3- и 4-суточных личинок также наблюдается 4 пептидных пика, но максимум интенсивности поглощения значительно ниже, чем на начальных этапах развития личинки, и составляет 240-300 mAU. На данном этапе развития личинок трутней, на интервале экстинкции 38-44 мл появляется слабо оформленный пептидный пик с малой степенью поглощения (20-40 mAU) и широким основанием. Возможно, в состав данной фракции могут входить пептиды со схожим строением и молекулярной массой. У 5- 6-суточных личинок количество пептидных фракций возрастает до 6, максимум интенсивности поглощения составляет 350 mAU. У 7-суточных трутневых личинок наблюдается 3 пептидных пика с максимумом интенсивности поглощения 250 mAU.

Низкомолекулярные пептиды личинок рабочих пчел всех исследованных возрастов в диапазоне молекулярной массы до 5 кДа разделялись от 4 до 10 фракций (рис. 6Б). В составе низкомолекулярных пептидов личинок 1-суточного возраста обнаружено 4 фракции с интенсивностью поглощения до 500 mAU. Можно отметить, что пептидный пик с интенсивностью поглощения 350-500 mAU встречается на каждом этапе развития личинки. Минимальное содержание пептидов идентифицировано у 4-суточных личинок: три пептидных пика с суммарным

содержанием пептидов - 521 усл.ед. (табл. 1), что в 8,5 раз меньше, чем у 2-суточных личинок - 4561(максимальное содержание пептидов). У личинок более поздних этапов развития увеличивается число пиков пептидов (до 10 пиков).

Таким образом, изменение количественного содержания пептидов в развивающихся личинках, возможно, отражает интенсивность процессинга белков на конкретном этапе развития личинок. Так, на начальных стадиях развития обнаружено малое количество пептидных пиков с высокой концентрацией, тогда как к заключительной стадии развития наблюдается увеличение разнообразия пиков пептидов, но с меньшей концентрацией.

Судя по полученным данным о пептидном составе в личинках разного возраста, можно предположить, что на начальных этапах развития личинки происходит генез предшественников регуляторных пептидов, которые по мере развития личинок подвергаются модификациям, в том числе под действием протеолитических ферментов, что может приводить к образованию «зрелых», функционально- активных пептидов, способных регулировать перестройки белковых молекул в клетке [3, 4, 15, 17].

#### **3.4. Активность катепсина D и трипсиноподобной протеазы в личинках трутней и рабочих пчел на разных стадиях развития.**

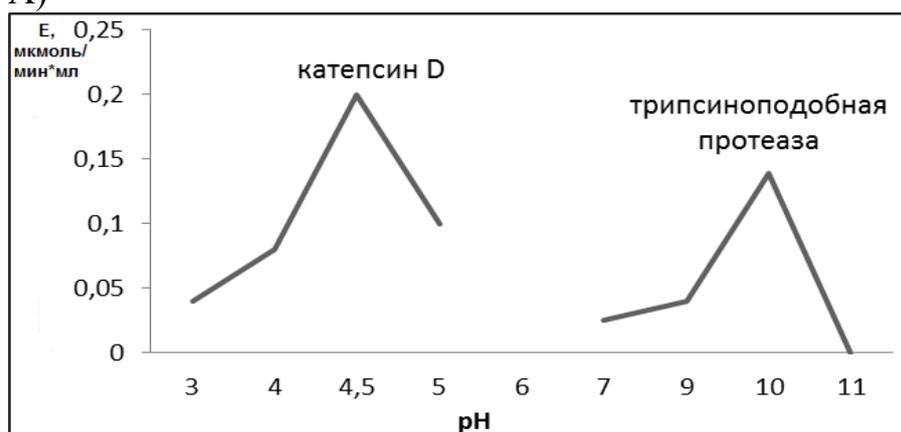
Интенсификация процессов метаболизма обеспечивает высокую скорость развития личинок пчел. При этом важнейшую роль выполняет внутриклеточный протеолиз [9, 30]. В связи этим, актуально изучение активности протеолитических ферментов: катепсина D и трипсиноподобной протеазы.

Большинство исследователей относят катепсин D к ферментам лизосомальной локализации, принимающих участие в реакциях неспецифического протеолиза. Трипсиноподобный фермент характеризуется чаще всего цитозольной локализацией, роль этого фермента связывают с

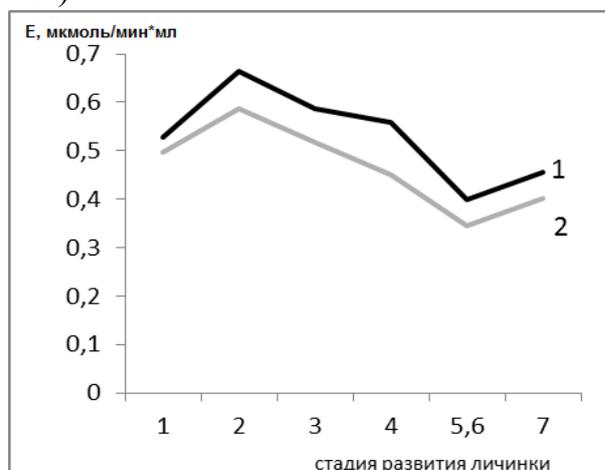
ограниченным протеолизом, который характерен для посттрансляционной фазы превращения белков и пептидов [12].

В таблице 3 отражено изменение активности исследуемых ферментов на разных стадиях развития личинок. Измерения активности фермента выполнялись в каждой возрастной группе личинок в шести технических повторях. Из литературных данных известно, что некоторые кинетические параметры ферментов насекомых отличаются от аналогичных ферментов позвоночных животных [43, 70]. Исходя из этого, нами был проведен частичный **кинетический анализ** с целью подбора условий определения активности ферментов, включая подбор оптимума рН действия ферментов, концентрации субстрата, времени инкубации, а также ингибиторный анализ (рис. 7).

А)



Б.1)



Б.2)

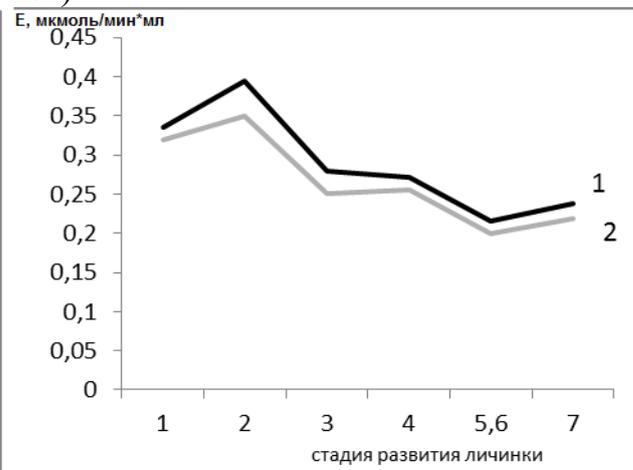


Рисунок 7. А) Зависимость активности протеолитических ферментов личинок от рН инкубационной среды. Б.1) Активность трипсиноподобной протеазы.

Б.2) Активность катепсина D. 1- Без ингибитора. 2- С применением специфического ингибитора. ( $M \pm m, n=4$ ),  $p < 0,05$ .

На рисунке 7А представлены результаты определения оптимума pH действия исследуемых протеолитических ферментов в личинках трутней и рабочих пчел. Для определения подклассовой принадлежности протеолитических ферментов использовали ингибиторный анализ с применением специфических ингибиторов протеиназ (рисунок 7 Б.1 и Б.2). Было установлено, что специфические ингибиторы (пепстатин для катепсина D и ингибитор Кунитца для трипсиноподобной протеазы) незначительно ингибируют активность исследуемых ферментов – не более чем на 7-10 %, т.е. являются неэффективными ингибиторами, что может свидетельствовать об ином строении активного центра данных ферментов у насекомых по сравнению с подобными ферментами позвоночных животных. Сходные данные по кинетическому анализу протеолитических ферментов насекомых были получены также другими исследователями [43].

Таблица 2. Удельная активность (мкмоль/мин\*мг белка) катепсина D и трипсиноподобной протеазы на разных стадиях развития личинок трутней и рабочих пчел ( $M \pm m, n=6$ ),  $p < 0,05$ .

Стадии развития личинки,сут	1		2		3		4		5-6 (ТР), 5 (РП)		7 (ТР) 6 (РП)	
	ТР	РП	ТР	РП	ТР	РП	ТР	РП	ТР	РП	ТР	РП
Катепсин D	2,4± 0,03	1,52± 0,02	2,5± 0,05	1,78± 0,01	4,67± 0,1	1,98± 0,01	3,76± 0,05	1,99± 0,01	3,4± 0,07	2,27± 0,02	2,75± 0,05	1,56± 0,01
Трипсиноподобная протеиназа	0,11± 0,01	0,083± 0,01	0,21± 0,01	0,092± 0,01	0,12± 0,01	0,13± 0,02	0,07± 0,01	0,15± 0,01	0,14± 0,01	0,094± 0,01	0,04± 0,003	0,11± 0,01

Примечание: ТР - личинки трутней, РП-личинки рабочих пчел.

Максимальная активность трипсиноподобной протеиназы у личинок трутней обнаружена на 2 сутки развития, затем наблюдается снижение активности и к 5-6 суткам активность вновь увеличивается (табл.2). То есть, можно считать, что в развитии трутневых личинок наблюдается «фазность»

изменения трипсиноподобной активности. У личинок трутней максимальная активность фермента обнаружена на 2-е сутки развития, к 3 – 4-ым суткам происходит уменьшение активности в 2 раза, затем, на 5-6-е сутки наблюдается увеличение активности трипсиноподобной протеазы в 2 раза, по сравнению с уровнем активности на 4-е сутки. К заключительной стадии развития активность фермента уменьшается на 70% по сравнению с максимальной активностью на 5-6-е сутки развития личинок.

Данные по изменению активности трипсиноподобной протеазы в личинках рабочих пчел приведены в таблице 2. Постепенное увеличение трипсиноподобной активности происходит с начала личиночной стадии до 4-х суток, где достигается максимум активности, затем, к 5-м суткам развития происходит снижение трипсиноподобной активности на 40% по сравнению с максимумом активности на 4-е сутки. На заключительной стадии развития личинки наблюдается небольшое увеличение активности (на 22%) по сравнению с 5-ми сутками.

Как показано на рисунке 8А, распределение активности трипсиноподобных ферментов в личинках трутней в целом коррелирует с распределением пептидов по стадиям развития личинки и содержанием белка, что может служить одним из доказательств участия данной группы ферментов в процессинге пептидов.

На рисунке 8Б показана динамика удельной активности трипсиноподобного фермента и содержание белка у личинок рабочих пчел разного возраста.

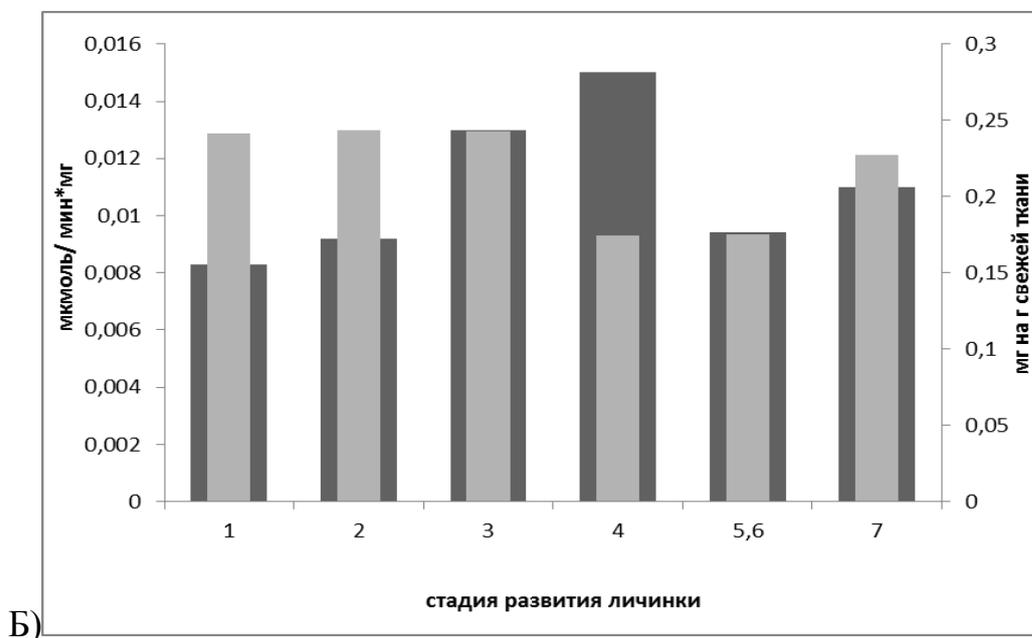
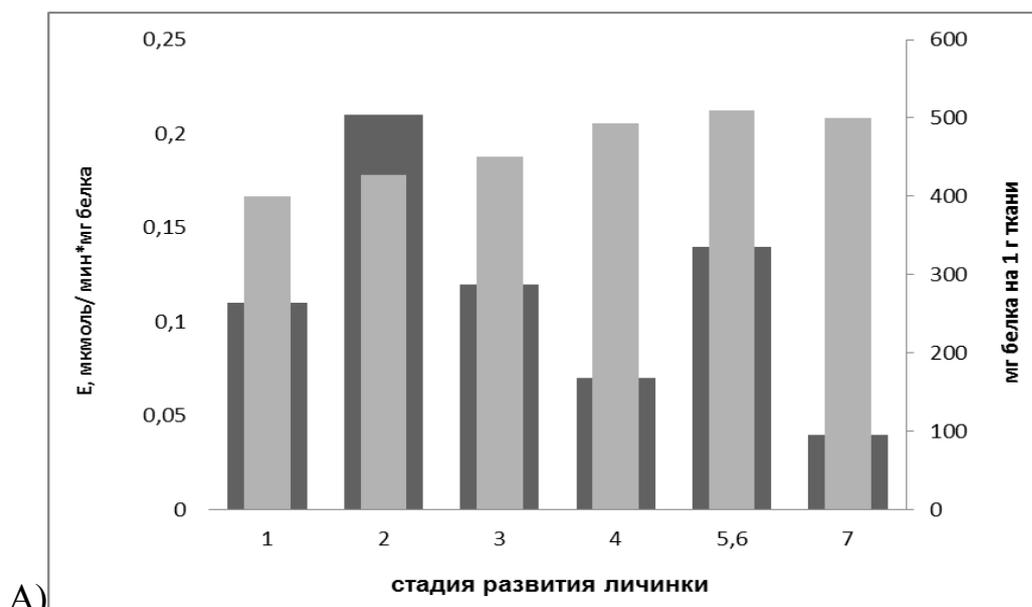


Рисунок 8. Удельная активность трипсиноподобных ферментов (мкмоль/мин\*мг белка) и содержание белка (мг/г ткани) в личинках на разных стадиях развития. А) Личинки трутневого расплода. Б) Личинки рабочих пчел. ■ – Удельная активность трипсиноподобных ферментов, ■ – содержание белка. ( $M \pm m$ ,  $n=6$ ).

Анализируя данные по динамике активности трипсиноподобных ферментов и содержания белка в онтогенезе личинок рабочих пчел, можно отметить, что несмотря на практически одинаковое количество белка в личинках на первые трое суток их развития, активность трипсиноподобных

ферментов возрастает, затем на 4 сутки, где содержания белка в личинках минимально, активность трипсиноподобных ферментов достигает максимума, что может быть свидетельством того, что именно на данном этапе развития личинки идет наиболее интенсивный генез регуляторных пептидов. На 5-6 и 7 сутки наблюдается баланс в содержании белка и уровне удельной активности трипсиноподобных ферментов.

Для более полного понимания характера выявленных изменений активности трипсиноподобных ферментов первичный экспериментальный материал был подвергнут дисперсионному анализу влияния возраста личинок на активность трипсиноподобных ферментов (табл. 3).

Таблица 3 – Дисперсионный анализ влияния возраста личинки на активность трипсиноподобных ферментов у личинок трутней и рабочих пчел.

	F <sub>ф</sub>	F <sub>ш</sub>														
		2-1	3-2	3-1	4-3	4-2	4-1	5-4	5-3	5-2	5-1	6-5	6-4	6-3	6-2	6-1
Т.п	147,8 *	32,5 *	46,2 *	13,7 *	13,7 *	60 *	27,4 *	36,8 *	23,1 *	23,1 *	9,4 *	37,7 *	-	14,5 *	60,8 *	28,2 *
Р.п	81,5 *	15,8 *	13,9 *	29,7 *	17,6 *	31,5 *	47,3 *	58,4 *	40,8 *	26,9 *	11,1 *	39,9 *	18,5 *	-	13 *	28,7 *

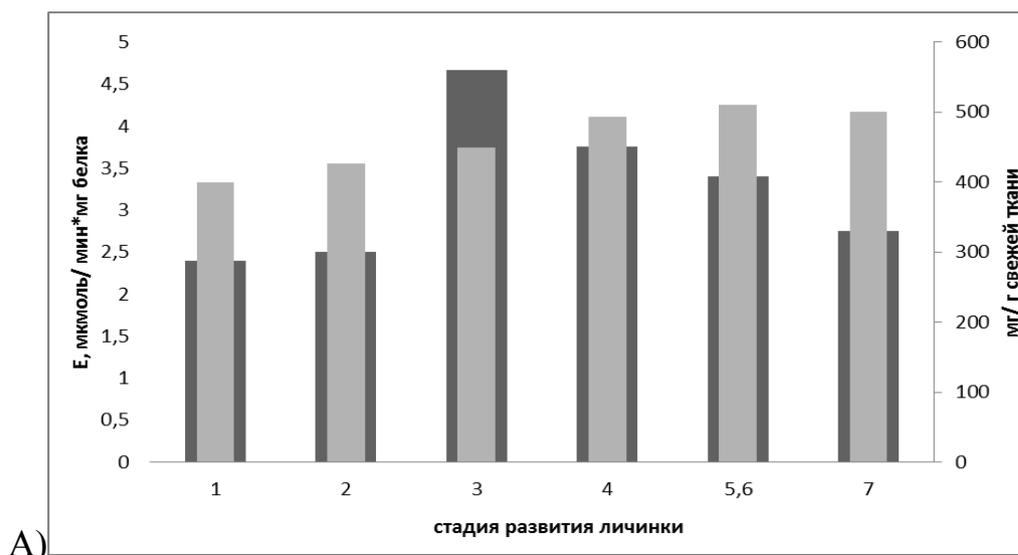
Примечание: значения отношения Фишера F<sub>ф</sub> и значения критерия Шеффе F<sub>ш</sub> по методике сравнения Ньюмена-Кейлса. \*- p < 0,05 относительно предыдущего значения.

Дисперсионный анализ влияния возраста личинок на активность трипсиноподобных ферментов показал достоверную зависимость активности исследуемого фермента от возраста (p < 0,05). Статистически значимая динамика активности трипсиноподобных ферментов наблюдается на протяжении всего онтогенеза личинок, недостоверным является отличие активности данной группы ферментов между 4 и 7 дневными личинками. На данных этапах развития личинки наблюдается минимальная активность трипсиноподобных ферментов, в то время как максимальная активность на 2 и 5-6 сутках развития личинок, является статистически значимой.

Другой протеолитический фермент, который был исследован в динамике развития личинок трутней и рабочих пчел, представитель лизосомальных ферментов - **катепсин D**. Результаты исследования изменения активности катепсина D в онтогенезе личинок представлены в таблице 2.

Установлена закономерность изменения активности катепсина D в онтогенезе личинок трутней (табл.2). Так, у личинок трутней минимальная активность фермента обнаружена на 1-2 сутки развития личинок, к третьим суткам происходит увеличение активности катепсина D в 2 раза, где наблюдается максимум активности фермента. Затем, на последующих стадиях развития, наблюдается постепенное снижение активности катепсина D.

Закономерность изменения активности катепсина D в онтогенезе личинок рабочих пчел (табл.2) отличается от таковой у личинок трутней. Так, наблюдается увеличение активности катепсина D по мере развития личинки с максимумом активности на пятые сутки. Затем, на заключительной стадии развития, наблюдается снижение активности катепсина D на 20% по сравнению с максимумом его активности на пятые сутки.



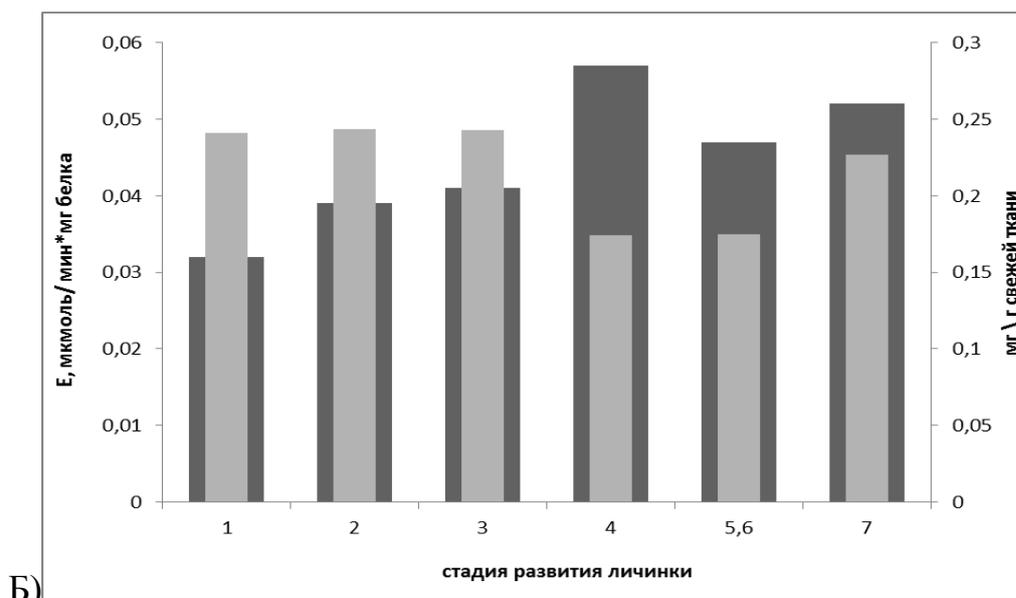


Рисунок 9. Удельная активность катепсина D (мкмоль/мин\*мг белка) и содержание белка (мг/г ткани) в личинках на разных стадиях развития. А) Личинки трутневого расплода. Б) Личинки рабочих пчел. ( $M \pm m$ ,  $n=6$ ). ■ – содержание белка, ■ – удельная активность катепсина D

Анализируя данные по корреляции удельной активности катепсина D и содержанию белка в онтогенезе личинок трутней (рис. 9А), можно отметить, что несмотря на возрастание содержания белка в онтогенезе личинок, активность катепсина D после резкого повышения на 3 сутки, начинает снижаться с 4 по 7 сутки развития личинки. Можно предположить, что именно на 3 сутки происходит наиболее интенсивное участие катепсина D в модификации белков, количество которых возрастает к 7 суткам.

Корреляция удельной активности катепсина D и содержания белка в онтогенезе личинок рабочих пчел (рис. 9Б), отражает рост активности фермента в первые трое суток развития личинок, несмотря на практически равное содержание белка на протяжении данного этапа (1-3 сутки). Затем к 4-м суткам происходит резкое возрастание активности катепсина D, а содержание белка резко уменьшается и остается на данном уровне у 4 и 5-6 суточных личинок. Можно предположить, что именно на 4 сутки происходит

наиболее интенсивное участие катепсина D в модификации белков, количество которых возрастает к 7 суткам.

Для более полного понимания характера выявленных изменений активности катепсина D первичный экспериментальный материал был подвергнут дисперсионному анализу влияния возраста личинок на активность ферментов.

Таблица 4. Дисперсионный анализ влияния возраста личинки на активность катепсина D у личинок трутней и рабочих пчел.

	F <sub>ф</sub>	F <sub>ш</sub>														
		2-1	3-2	3-1	4-3	4-2	4-1	5-4	5-3	5-2	5-1	6-5	6-4	6-3	6-2	6-1
Т.п.	256,9 *	18,9 *	51 *	70 *	22,4 *	28,7 *	47,6 *	14,3 *	36,7 *	14,3 *	33,3 *	19,5 *	33,8 *	56,2 *	-	13,8 *
Р.п.	29,5 *	10,1 *	7,7 *	17,9 *	-	8 *	18,2 *	16 *	15,7 *	8 *	2,13 *	26,9 *	10,8 *	11,1 *	18,8 *	29 *

Примечание: значения отношения Фишера F<sub>ф</sub> и значения критерия Шеффе F<sub>ш</sub> по методике сравнения Ньюмена-Кейлса. \*- p < 0,01 относительно предыдущего значения.

Дисперсионный анализ влияния возраста личинки на активность катепсина D показал достоверную зависимость активности данного фермента от стадии развития личинки. Активность катепсина D увеличивается с возрастом личинки и достигает максимума на третьи сутки. Недостоверность отличий выявлена лишь между 2 и 7-суточных личинок у трутней и между 3 и 4 суточными личинками рабочих пчел.

### 3.5. Физиологические эффекты пептидной фракции личинок трутневого расплода.

В результате исследования физиологических эффектов (анксиолитический и ноотропный) фракции пептидов с помощью теста «Открытое поле» было обнаружено, что введение пептидов крысам вызывает у них достоверное уменьшение стрессовых реакций, что выражается в

увеличении двигательной (число вертикальных стоек) и ориентировочно-исследовательской активности (число заходов в центр, обнюхиваний и реакций груминга). Кроме этого, у опытных крыс снижается уровень дефекации, что также говорит о снижении эмоциональной тревожности и стресса у животных. (табл. 5).

Таблица 5. Влияние фракции пептидов молекулярной массой до 5 кДа личинок трутневого расплода на регистрируемые параметры в тесте «Открытое поле».

Регистрируемый параметр	Контроль	Опыт
ГДА	37±3,2	37,57±3,83*
ВДА	4,66±20,43	11,86±2,99
Заход в центр, %	16,67±2,01	57,14± 1,92 **
Обнюхивание	1,66±0,32	2,57±0,57
Реакции отчаяния	83,3 ±1,57	28,57± 1,74*
Дефекация	1,5 ± 0,38	0, 43 ± 0,7**
Груминг	2,16 ± 0,05	5± 0,11**

Примечание: ГДА – горизонтальная двигательная активность, ВДА – вертикальная двигательная активность; \* - достоверные отличия при  $p < 0,05$ ; \*\* - при  $p < 0,01$ .

Влияние фракции пептидов молекулярной массой до 5 кДа на формирование условного пищедобывательного рефлекса проводилось в условиях несформировавшейся системы условных рефлексов (т.е. на ранних этапах обучения). Обнаружено, что на фоне введения пептидов у опытной группы крыс критерий осуществления правильных реакций уже на второй день эксперимента составил 91% в то время как у контрольной группы крыс - 62%. Введение пептидов также способствует сокращению латентного периода условных реакций на начальных этапах (до 4-5 секунд), по сравнению с контрольной группой животных (6-7 секунд) (табл. 6).

Таблица 6. Влияние фракции пептидов молекулярной массой до 5 кДа личинок трутневого расплода на регистрируемые параметры в тесте «Выработка условного пищедобывательного рефлекса».

<b>Критерий правильности условных реакций (% правильных реакций)</b>						
	1день	2день	3день	4день	5день	6день
Контроль	43,3	62,2	76,6	88,8	91,1	96,6
Опыт	76,6	91,1**	91,25	93,75**	95	98,75
<b>Латентный период (время пробежки, в секундах)</b>						
	1день	2день	3день	4день	5день	6день
Контроль	11,09±1,9	9,28±2	7,88±1,26	6,77±0,9	6,14±0,88	6,08±0,62
Опыт	8,26±1,1	6,89±0,87**	6,28±1,08	5,99±1,1**	4,79±0,63	4,69±0,74

Примечание: \*\* -  $p < 0,01$  по сравнению с контролем (по критерию Манна-Уитни).

Таким образом, показано, что введение данной фракции оказывает ноотропное действие, проявляющееся в однонаправленном усилении формирования условных пищедобывательных рефлексов у опытной группы животных.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Современные условия существования человека: неблагоприятная экологическая обстановка, ухудшения качества продуктов питания, хронические стрессы, привели к росту числа вирусных, бактериальных и хронических заболеваний. Фармацевтическая промышленность поставляет на рынок синтетические лекарственные средства, которые имеют широкий спектр противопоказаний и побочных эффектов. Ввиду этого в последние десятилетия все больше ученых концентрируют свое внимание на поиске природных аналогов синтетических лекарств [15,16,25, 221].

К настоящему времени в литературе накоплена обширная информативная база о применении препаратов продуктов пчеловодства в медицине, об их физиологических эффектах. Подробно описываются их положительные фармакологические эффекты при заболеваниях печени, снижении иммунитета, вирусных и бактериальных инфекций и др [15, 25].

Еще одной областью широкого применения продуктов пчеловодства является спорт. Применение продуктов пчеловодства для восстановления после физических нагрузок, а также для повышения спортивной результативности имеет многолетнюю практику. В отличие от синтетических лекарственных средств, продукты пчеловодства не имеют побочных эффектов, не запрещаются антидопинговым комитетом и значительно дешевле синтетических аналогов [16].

Что же касается сельского хозяйства, то исследование влияния продуктов пчеловодства на сельскохозяйственных животных с каждым днем набирает популярность, ввиду запрета использования в качестве кормовых добавок препаратов, содержащих стероидные гормоны для увеличения прироста массы у бройлеров, свиней, рогатого скота, овец и др. [215, 221].

В ходе эволюции выработались механизмы поддержания гомеостаза внутри пчелиной семьи такие, как например - кастовая дифференцировка и распределение ролей внутри семьи, замена слабо плодовитой матки,

изгнание трутней в конце лета для экономии корма зимой или содержание их небольшого количества для регулирования температуры внутри улья и тд. Данные механизмы являются выигрышной стратегией формирования устойчивой надорганизменной системой существования.

Для понимания механизмов развития живого организма чрезвычайно важно изучать регуляцию перестройки белков на молекулярном уровне. Известно, что каждый этап онтогенеза характеризуется определенным набором метаболических процессов: биосинтез белка и его деградация, синтез различных биологически активных веществ, в том числе и регуляторных пептидов.

Постэмбриональное развитие насекомых происходит в тесном взаимодействии нескольких гормональных систем: пептидных, стероидных и ювенильных. Они контролируют метаморфоз, личиночные процессы, прохождение диапаузы, пигментацию, меланизацию и поведенческие реакции [21, 42]. Наиболее многочисленным и вариабельным классом являются пептидные гормоны насекомых, участвующие в контроле постэмбрионального развития, гомеостаза, поведенческих реакций и репродукции [4, 42].

Согласно современным представлениям, регуляторное действие почти всех гормонов, в том числе и пептидных, в организме животных осуществляется за счет управления активностью определенных ферментных систем, реализующих в клетках — мишенях специфические физиологические и биохимические эффекты этих сигнальных веществ [3, 14, 21, 42].

Другими словами, изучение динамики активности протеолитических ферментов в онтогенезе, прежде всего, представляет интерес для понимания роли и механизмов функционирования системы регуляторных пептидов на конкретном этапе развития организма.

Учитывая вышеизложенное, интересным представляется исследование регуляторных пептидов и ферментов их обмена на конкретных этапах онтогенеза личинок таких представителей пчелиной семьи как трутни и

рабочие пчелы. Изучение белкового и пептидного спектра, а также активности протеолитических ферментов в онтогенезе личинок может дать существенную информацию о процессах клеточной дифференцировки и морфогенеза, сопровождающих их развитие.

Белковый спектр разных представителей пчелиной семьи был исследован рядом авторов, при этом большей частью изучены белки гемолимфы и отдельных органов медоносной пчелы: пищеварительного тракта, сердца, яичников и др. [121, 123], подробно изучен белковый спектр жирового тела в онтогенезе всех представителей пчелиной семьи [96]. В сравнительном аспекте был проведен электрофоретический анализ белкового спектра трутневого расплода и маточного молочка [121, 122, 123].

В нашей работе методом электрофореза в 7,5% ПААГ показан спектр белков в ходе развития личинок трутней и рабочих пчел. Обнаружено отличие в распределении белков по зонам на начальных этапах онтогенеза личинок трутней и рабочих пчел: у односуточных личинок трутней идентифицировано всего 4 белковые зоны, в то время как у личинок рабочих пчел того же возраста идентифицировано 9 зон. Такое различие в количестве белковых зон, а, следовательно, в разнообразии белков, может быть следствием двух разных путей развития трутней и рабочих пчел: из неоплодотворённых и оплодотворенных яиц.

Однако картина распределения белков по зонам на более поздних этапах развития личинок трутней и рабочих пчел приобретает аналогичный вид и насчитывает 11 белковых фракций. Увеличение разнообразия белков на поздних этапах развития личинки может быть связано с началом специализации клеточных структур и закладкой органов и тканей. Вполне возможно, что на более поздних этапах развития личинок пути внутриклеточных дифференцировок и регуляции метаболизма приходят к единому плану (табл. 7).

Rf	1-РП	2-РП	3-РП	4-РП	5-РП	6-РП
0,1	+	+	+			
0,2	++	++	++	+	+	++
0,3	+	+	+	++	++	+
0,4	++	++	++	++	++	+++
0,5	+	+	+	++	++	++
0,6	+	+	+	+	+	+
0,7						
0,8	+	+	+	+	+	+
0,9				+	+	+
1						

А)

Rf	1-ТР	2-ТР	3-ТР	4-5-ТР	6-7-ТР
0,1	+	+	+	++	++
0,2	+	+	+	++	++
0,3	+	+	+	++	++
0,4		++	++	++	++
0,5		+	+	+	+
0,6	+	+	+	+	+
0,7		+	+	+	+
0,8					
0,9		+	+	+	+
1					

Б)

Таблица 7. Значение Rf водорастворимых белков личинок разного возраста.

А) Личинки рабочих пчел. Б) Личинки трутней.

Судя по данным, полученным в настоящей работе, о количественной динамике белков и пептидов в онтогенезе трутневых личинок и личинок рабочих пчел, можно отметить, что максимальное количество пептидов наблюдается в первые двое суток развития личинок. Обнаруженный нами факт, возможно, указывает на то, что наиболее интенсивный обмен регуляторных пептидов наблюдается именно на начальных этапах. Причем, количественная динамика пептидов у личинок трутней и рабочих пчел, начиная с четвертых суток, несколько отличается: у трутней, начиная со вторых суток и по седьмые, количество пептидов убывает, а у личинок рабочих пчел на седьмые сутки наблюдается увеличение содержания пептидов. Этот факт, может говорить об интенсификации внутриклеточных процессов, в которых принимают участие регуляторные пептиды, на заключительном этапе развития личинки.

Содержание пептидов по мере развития личинки уменьшается, в то время как количество белка увеличивается. Причем, количество белка у личинок трутней увеличивается линейно, а у личинок рабочих пчел картина количественного содержания белка в онтогенезе частично повторяет картину

количественного содержания пептидов. Возможно, различная картина динамики белков и пептидов у личинок трутней и рабочих пчел является следствием двух различных путей развития организма - из неоплодотворенной и оплодотворенной яйцеклетки.

Личинки рабочих пчел развиваются из оплодотворенных яиц, а личинки трутней из неоплодотворенных. Причем различия в размере яиц незначительны, но яйца рабочих пчел развиваются значительно быстрее, чем трутневые [111]. Частота дыхания этих двух видов яиц зависит от температуры, но не было найдено никакой разницы в количестве потребляемого кислорода между мужскими и женскими яйцами [145].

Причем, уход рабочих пчел - нянек за личинками трутней намного превосходит их вклад в развитие личинок рабочих пчел. Этим, возможно объясняется стремительное развитие личинок трутней и такое большое увеличение массы личинки [67]. Для личинок рабочих пчел было показано, что увеличение массы личинки в начале личиночной стадии имеет генетический компонент [191].

Изучение спектра пептидов молекулярной массой до 5 кДа (по литературным данным именно низкомолекулярные пептиды обладают регуляторными свойствами) методом ВЭЖХ, позволило установить динамику в количестве пептидных фракций по мере развития личинок.

Нами установлено, что с возрастом увеличивается количество пептидных фракций, но концентрация пептидов в этих фракциях уменьшается. Наибольшая концентрация пептидов наблюдается во фракциях на первые-вторые сутки развития личинки, причем количество этих пиков всего 3-4.

Этот факт дает основание предположить, что на начальных стадиях развития личинки происходит интенсивный синтез и накопление регуляторных пептидов и их предшественников, которые при помощи протеолитических ферментов подвергаются модификации, что приводит к

образованию «зрелых» пептидов, способных регулировать перестройки белковых молекул в клетке на последующих этапах развития личинок

Стремительное развитие личинок насекомых сопровождается высокой интенсификацией процессов метаболизма, ключевыми регуляторами которых являются протеолитические ферменты.

Основной ролью протеолитических ферментов лизосом в клетке является разрушение «отработанного» белка. Второй путь превращения белка в клетке – нелизосомальный, где протеолиз, в котором участвует большой набор индивидуальных пептидгидролаз, часто является источником образования активных форм белков, ферментов, а также пептидов, наделенных регуляторными функциями [10].

Руководствуясь этим, мы предприняли попытку изучить активность таких протеолитических ферментов как катепсин D и трипсиноподобные ферменты. Эти ферменты относительно хорошо изучены по многим параметрам у других насекомых, но сведения в литературе о данных ферментах в личинках трутней и рабочих пчел весьма скудны [12].

Большинство исследователей относят катепсин D к ферментам лизосомальной локализации, принимающих участие в реакциях неспецифического протеолиза [24, 31, 32]. Также по литературным данным известно, что катепсину D и другим кислым протеазам отводится лидирующая роль в метаболизме запасных белков на стадии эмбриогенеза насекомых, а также ключевая роль в процессах метаморфоза насекомых [109, 130, 168].

Что же касается трипсиноподобных ферментов, то большинство исследователей его роль сводят лишь к пищеварительной функции [5, 15, 16, 38], но в литературе встречаются данные об участии данной группы ферментов в генезе регуляторных пептидов у высших животных [10]. Одним из факторов, затрудняющим изучение роли трипсиноподобных ферментов в клетке, является часто перекрывающаяся специфичность действия, характерная для пептидгидролаз. Эта группа ферментов участвует в

превращении белковой молекулы после ее образования на рибосоме и т.о. поддерживает на определенном уровне на каждом этапе онтогенеза личинки важнейшие для жизнедеятельности белковые вещества, наделенные специфическими функциями, будь это структурные, транспортные белки, ферменты или регуляторные пептиды.

В нашей работе исследована динамика активности трипсиноподобных ферментов в онтогенезе личинок трутней и рабочих пчел. Показано, что максимальная активность трипсиноподобных ферментов у личинок трутней обнаружена на вторые сутки развития, в то время как у личинок рабочих пчел на четвертые сутки. Полученные нами данные дают основание полагать, что в личинках трутней и рабочих пчел процессы обмена регуляторных пептидов по стадиям развития несколько отличаются, судя по всему, это может быть обусловлено разной продолжительностью личиночной стадии у представителей пчелиной семьи.

В процессе онтогенетического развития организма важные функции выполняет лизосомальная ферментная система. Ферменты лизосом участвуют в процессах гаметогенеза, обновления тканей, расщепления отживших элементов клетки. Основной функцией этих органелл является внутриклеточное пищеварение. Кроме того, роль лизосомального протеолитического аппарата приобретает особенное значение в метаболических реакциях, связанных с преобладанием катаболических реакций, мобилизацией белковых и других ресурсов организма, которые уместно обозначить термином “метаболический стресс”.

Аспартильные протеиназы (AP), к которым относится исследованный нами катепсин D, широко изучены у млекопитающих, но гораздо хуже у насекомых [118]. Данная группа ферментов в онтогенезе насекомого влияет на место, стадию и временные рамки ключевых процессов развития.

Изучение активности катепсиноподобных ферментов на конкретном этапе развития личинки проливает свет на тот факт, что для поддержания жизненного цикла есть определенный баланс различных катепсинов.

Деятельность этих ферментов контролируется на уровне транскрипции и трансляции. Активность этих ферментов изменяется в ответ на такие физиологические факторы, как гормоны, в том числе и регуляторные пептиды.

По нашим данным изучения динамики активности катепсина D в личинках трутней и рабочих пчел, максимальная активность обнаружена на третьи- четвертые сутки развития личинок. Причем у трутней максимум активности приходится на 3 сутки развития, а у рабочих пчел на 4 сутки. Это позволяет предположить, что на данном этапе развития личинки происходит интенсивный катаболизм белка в лизосомах, что может также приводить к образованию и накоплению регуляторных пептидов в клетке, о чем свидетельствует также высокое содержание пептидов на третьи-четвертые сутки развития личинок.

Анализируя данные по динамике активности исследуемых протеолитических ферментов в онтогенезе личинок, можно отметить, что в отдельных случаях уровень активности катепсина D и трипсиноподобных ферментов коррелирует с содержанием белка и пептидов на соответствующих этапах онтогенеза.

Данное обстоятельство может свидетельствовать в пользу предположения об участии этих ферментов в процессах протеолитической модификации внутриклеточных белков на ранних стадиях развития личинки. Вместе с тем эти ферменты являются гидролазами и потому они в той или иной мере обеспечивают разрушение определенной части пептидов до свободных аминокислот, внося свой вклад в гомеостаз белков, пептидов, аминокислот [10].

На рисунке 12 представлены результаты корреляционного анализа содержания пептидов, белков и активности протеолитических ферментов. Выявлена корреляция между изменением активности катепсина D в онтогенезе личинок и количественным содержанием белков на разных стадиях развития личинок (рисунок 12). Однако, в отличие от

трипсиноподобных ферментов, корреляция между активностью катепсина D и содержанием пептидов на разных стадиях развития личинки не выявлена. Данное обстоятельство является ожидаемым фактом, поскольку катепсин D является лизосомальной протеиназой, принимающей участие в обмене и модификации белков, генез регуляторных пептидов, как известно, протекает в цитоплазме [10].

В отличие от трипсиноподобных ферментов, корреляция активности катепсина D и содержания пептидов не выявлена, что является ожидаемым фактом, поскольку катепсин D является лизосомальной протеиназой, принимающей участие в обмене и модификации белков. Данный факт подтверждается наличием корреляции между активностью катепсина D и концентрацией белка.

Выявлена положительная корреляция между активностью катепсина D личинок и содержанием белков на разных стадиях развития личинок (рис. 10). Однако, в отличие от трипсиноподобных ферментов, корреляция между активностью катепсина D и содержанием пептидов на разных стадиях развития личинки не выявлена. Данное обстоятельство является ожидаемым фактом, поскольку катепсин D является лизосомальной протеиназой, принимающей участие в обмене и модификации белков, а генез регуляторных пептидов, как известно, протекает в цитоплазме [3, 10,39].

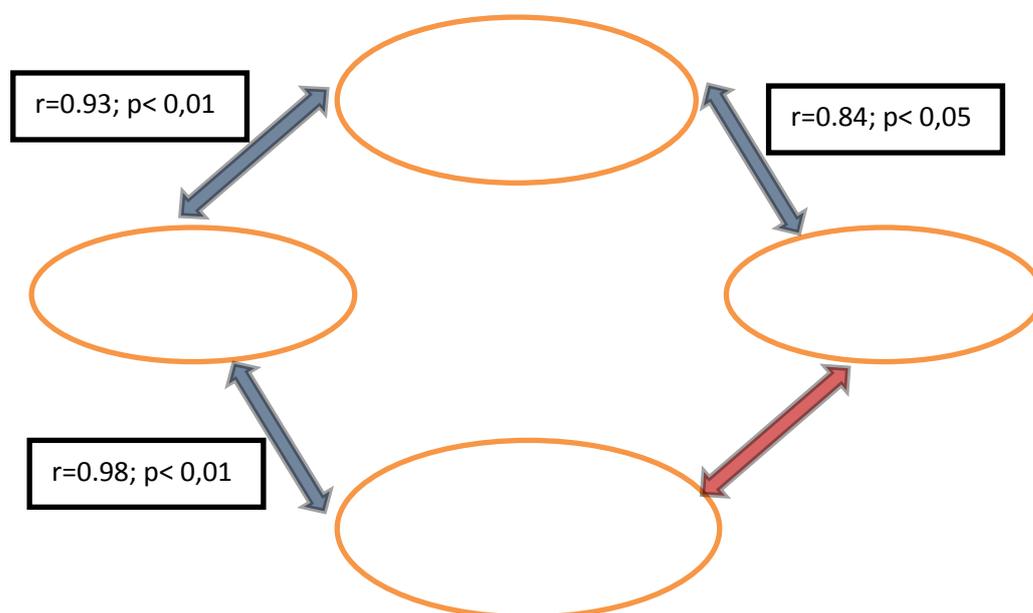


Рисунок 10. Корреляционный анализ зависимости активности ферментов и содержания белков и пептидов в онтогенезе личинок трутней и рабочих пчел. (Синяя стрелка - есть корреляция, красная стрелка - отсутствует корреляция).

В ходе наших исследований с помощью физиолого-фармакологических тестов «Открытое поле» и «Выработка условных пищедобывательных рефлексов» на лабораторных животных была испытана фракция пептидов молекулярной массой до 5 кДа. Данная фракция получена из исходного 10%-го экстракта личинок трутней с помощью метода гель-фильтрации на колонке, заполненной сефадексм G-25. В результате гель-фильтрации было получено две фракции: высокомолекулярная (не обладает выраженными физиологическими эффектами) и низкомолекулярная фракция пептидов до 5 кДа, которую использовали в экспериментах на животных [11, 27, 28].

В ходе экспериментов с использованием тестов «Открытое поле» и «Выработка условных пищедобывательных рефлексов» на лабораторных животных были выявлены анксиолитический и ноотропный эффекты. Анксиолитический эффект заключался в том, что крысы, которым интраназально вводились пептиды, испытывали меньший стресс в новых условиях среды по сравнению с контрольной группой животных, которым вводился 0,9% раствор NaCl. Уровень стресса определялся согласно методике [11, 27, 28].

Ноотропный эффект пептидов заключался в том, что крысы опытной группы быстрее формировали выработку условного рефлекса, чем крысы контрольной группы. Параметры, по которым определялась скорость формирования условного рефлекса, описаны в методике [11, 27, 28].

Таким образом, пептиды до 5 кДа, полученные из личинок трутневого расплода вызывают достоверное снижение уровня стресса у крыс в новых условиях среды, а также способствуют активизации процессов памяти.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современных условиях существования человека как никогда актуален поиск природных средств, обладающих выраженными физиологическими эффектами, не уступающих эффектам синтетических препаратов, которые помимо высокой стоимости имеют целый ряд побочных эффектов. Этими и многими другими причинами обусловлен повышенный интерес исследователей к выделению биологически активных веществ из природных объектов.

Представители пчелиной семьи давно находятся в центре внимания специалистов разных областей науки: биологов, биохимиков, генетиков, физиологов и тд. Она представляет собой целостную надорганизменную систему, где каждая особь запрограммированно выполняет отведенную ей функцию. Особый интерес представляет развитие пчелы на личиночной стадии, поскольку при этом представляется уникальная возможность проведения сравнительных исследований с использованием одновременно различных каст пчелиной семьи, различающихся по набору хромосом. К тому же, чрезвычайно высокая скорость процессов метаболизма на личиночной стадии требует наличия в клетке высокого содержания регуляторных веществ, одними из которых, несомненно, выступают регуляторные пептиды и протеолитические ферменты.

Исследована динамика содержания пептидов на разных этапах развития личинок, что позволит выделить личинки с максимальным содержанием пептидов для дальнейших исследований их физиологических эффектов и возможности применения в качестве природного аналога синтетических средств.

С помощью метода «Открытое поле» впервые показан анксиолитический эффект фракции пептидов молекулярной массой до 5 кДа, полученной из личинок трутней. Данный эффект заключался в достоверном снижении реакций стресса у животных опытной группы по сравнению с контрольной.

С помощью метода «Выработка условного пищедобывательного рефлекса» впервые показан ноотропный эффект фракции пептидов личинок трутней молекулярной массой до 5 кДа. Данный эффект показан в увеличении количества правильных реакций и сокращении латентного периода условных реакций на начальных этапах эксперимента у животных опытной группы по сравнению с контрольной.

Проведена сравнительная характеристика качественного и количественного состава белков, пептидов и активности протеолитических ферментов в онтогенезе у личинок трутней и рабочих пчел. Полученные данные дополняют существующие представления об особенностях механизмов онтогенеза на личиночной стадии развития насекомых.

Выявленный характер изменений в составе белков и пептидов в личинках трутней и рабочих пчел свидетельствует об особенностях кастовой дифференцировки механизмов экспрессии белков и генеза регуляторных пептидов. Количественные данные о пептидах в личинках разного возраста послужит основанием для их выделения и изучения биологической активности, с целью их применения в фармакологии и медицине.

Впервые установлены закономерности изменения активности некоторых протеолитических ферментов, участвующих в обмене белков и пептидов в личинках трутней и рабочих пчел. Выявленная положительная корреляция между количественным содержанием белков и активностью катепсина D, подтверждает представление о роли данного фермента в обмене белка в клетке.

В целом, выявленный параллелизм между изменением содержания белков и пептидов и активностью изученных протеолитических ферментов на разных стадиях развития личинок может служить подтверждением существующей гипотезы о наличии в клетке полифункциональной системы регуляции, включающей в себя белки, пептиды и протеолитические ферменты [15, 17].

## ВЫВОДЫ

1. Выявлены закономерности количественного и качественного изменения пептидов и белков на разных стадиях личиночного развития трутней и рабочих пчел. Данные закономерности имеют могут являться следствием различной интенсивности процессов обмена белков и образования пептидов, вследствие генетических различий между гаплоидными и диплоидными кастами личинок, а также особенностей морфогенеза личинок и выращивания их в пчелиной семье.

2. Онтогенез пчелы медоносной на стадии личинки сопровождается положительной динамикой (увеличением) общего количества белка и обратной динамикой (уменьшением) количества пептидов. Выявленные закономерности являются следствием генетических особенностей, а также особенностей питания личинок разного возраста.

3. Установлены различия в характере изменения активности одного и того же протеолитического фермента во время развития личинок двух разных каст. Для личинок трутней максимум активности трипсиноподобной протеазы отмечен на 2-е сутки развития, для личинок рабочих пчел - на 4-е сутки. Максимум активности катепсина D у личинок трутней наблюдается на 3-и сутки развития, в то время как у рабочих пчел на 5-е сутки. Данные различия обусловлены как генетическими особенностями, так и разной продолжительностью личиночной стадии.

4. Выявлена положительная корреляция между количественным содержанием белка и активностью катепсина D и между количественным содержанием пептидов и активностью трипсиноподобной протеазы.

5. С помощью метода «Открытое поле» показан анксиолитический эффект фракции пептидов молекулярной массой до 5 кДа, полученной из личинок трутней. Данный эффект заключался в достоверном снижении реакций стресса у животных опытной группы по сравнению с контрольной.

6. С помощью метода «Выработка условного пищедобывательного рефлекса» впервые показан ноотропный эффект фракции пептидов личинок трутней молекулярной массой до 5 кДа. Данный эффект показан в увеличении количества правильных реакций и сокращении латентного периода условных реакций на начальных этапах эксперимента у животных опытной группы по сравнению с контрольной.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Результаты данного исследования позволят отбирать личинок с максимальным содержанием регуляторных пептидов, обладающих анксиолитическим и ноотропным эффектами, для дальнейшего их выделения и идентификации, с целью создания препаратов на их основе. Данные препараты будут являться природной альтернативой синтетическим средствам, используемых в фармакологии, спорте и сельском хозяйстве в ноотропной терапии для снижения стрессовых реакций и улучшения мозговой деятельности.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АПФ - ангиотензинпревращающий фермент
- БАПНА- Натрий-бензоил-DL-аргинин-4(п)-нитроанилид
- ВЭЖХ- высокоэффективная жидкостная хроматография
- ДТТ - дитиотреитол
- ПААГ - полиакриламидный гель
- ПХМБ - п-хлормеркурийбензоат
- ТХУ - трихлоруксусная кислота
- ТЭМЭД – N, N,N,N-тетраметилэтилендиамин
- ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид
- ЦНС – центральная нервная система
- ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота
- APs – аспартильные протеиназы
- BmCathD- катепсин D тутового шелкопряда
- Cath - катепсин
- SDS – додецил сульфат натрия

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В. К. Химия протеолиза // М. 1991. С.
2. Арзамасцев А.П. Руководство к лабораторным занятиям по фарм. химии // М.: Медицина. 2001.
3. Ашмарин И.П., Обухова М.Р. Регуляторные пептиды: функционально-непрерывная совокупность // Биохимия. 1986. Т. 51.№4. С. 531-545.
4. Ашмарин И. П. Сигнальные молекулы // Нейрохимия. 2001. Т. 18. № 4. С. 243-250.
5. Бей-Биенко Г. Я. Общая энтомология // М.: Высшая школа. 2005. С. 416
6. Будникова Н.В. Биологически активные соединения в трутневом расплоде // Ж. «Пчеловодство». 2009. №6. С.52.
7. Бурмистрова Л.А. Перспективный продукт пчеловодства // Ж. «Пчеловодство». 2005. №8.
8. Валуева Т. А., Мосолов В. В. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений // Успехи биологической химии. 2002. Т. 42. С. 193—129.
9. Высоцкая Р. У., Сорокина В. В., Сидоров В. С. Лизосомальные ферменты в ходе жизненного цикла слепней рода *Nybomitra* // Паразитология. 1995.Т. 29. №2. С. 83-89.
10. Генгин М. Т. Особенности структурно - функциональной организации и физико- химические свойства нелизосомальных пептидгидролаз мозга животных // Дисс.д.б.н. Пенза. 2002. С.13-15.
11. Генгин М.Т. Моисеева А.А. Биопрепарат ноотропного и анксиолитического характера действия // Открытые инновации – вклад молодежи в развитие региона: сб. Материалов регионального молодежного форума. 2013. Т.2. С.78-80.
12. Гришина Ж.В., Генгин М. Т. Исследование активности протеолитических ферментов в личинках трутневого расплода на разных стадиях развития // Ж. Пчеловодство. 2016.№ .2. С. 25-27.

13. Гришина Ж.В., Генгин М. Т., Исследование белков и пептидов в личинках трутневого расплода на разных стадиях развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион Естественные науки. 2015. №4 (12). С. 4-10.
14. Гришина Ж.В., Генгин М. Т., 2016. Качественный и количественный состав пептидов в онтогенезе личинок трутней и рабочих пчел // Международный научно- исследовательский журнал «Успехи современной науки». г. Белгород. №11. Т.5.С.135-140.
15. Гомазков О. А. Функциональная биохимия регуляторных пептидов // М.: Наука.1993.
16. Дубцова Е. А. Состав, биологические свойства меда, пыльцы и маточного молочка и возможность их применения в лечебном питании // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2009. №3. С. 36-41.
17. Ериков В.М., Пунякин А.К. Влияние биологически активных продуктов пчеловодства на некоторые показатели минерального обмена у спортсменов // Вестник Рязанского государственного университета им. С.А. Есенина. 2008. №18.
18. Кислицын Ю. А. Выделение и первичная структура трипсина камчатского краба // Биоорганическая химия.2003. Т. 29. №3. С. 296-276.
19. Клунова С. М. Балобанова С.П. Изучение влияния аналога ювенильного гормона на активность протеолитического комплекса ферментов тканей и органов тутового шелкопряда *Bombyx mori* на заключительном этапе его личиночного развития // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: естественные науки. 2010. № 4. С. 77-81.
20. Кривцов Н.И. Получение и использование продуктов пчеловодства / Н. И. Кривцов, В. И. Лебедев. // М.: Нива России. 1993. 286 с.
21. Кутузова Н. М., Девятников Д. Д., Яныкина Е. А. Гормональная регуляция активности ключевых ферментов насекомых // Преподаватель XXI век. 2009. №3-2.

22. Лазарян Д. С., Щекунов А. В., Сотникова Е. М. Электрофоретическое изучение белкового состава расплода пчел и маточного молочка // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37. №1.
23. Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биол. спец. вузов // М.: «Высшая школа». 1990. С.352.
24. Локшина Л.А. Реакции ограниченного протеолиза и их регуляторное значение // Успехи биол. химии. 1977. Т.8. С. 162-184.
25. Макарова В.Г. Продукты пчеловодства: биологические и фармакологические свойства, клиническое применение / В.Г. Макарова. Избр. лекции. Рязань. 2000. с.127.
26. Мишуковская Г. С. , Мурзабаев Н.Р., Кузнецова Т. Н. Хозяйственно полезные признаки пчёл при использовании микробиологических препаратов // Известия ОГАУ. 2013. №3 (41) С.163-165.
27. Моисеева А.А., Генгин М.Т. Изучение ноотропного эффекта биопрепарата на основе личинок трутневого расплода // Вестник ВОЛГГМУ: приложение (Материалы V Всероссийского научно-практического семинара «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств»). 2014. С. 86-87.
28. Моисеева А. А., Генгин М. Т., Гришина Ж. В. Нейростимулирующие свойства препарата пептидов, выделенных из личинок трутневого расплода // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион Естественные науки №4 (12).2015. С. 4-10.
29. Мясоедов Н.Ф., Романова Г.А., Шрам С.И., Шакова Ф.М., Силачев Д.Н. Формирование пространственной памяти у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга; эффекты синтетического аналога актг (4-7) // Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. N4. 2008.С.458-466.
30. Немова Н.Н., Бондарева Л.А. К вопросу об эволюции протеолитических ферментов. // Биомедицинская химия. 2008. Т. 54. В. 1. С. 42-57.

31. Нурмагомедова П.М. Пептидгидролазная активность в тканях мозга на ранних этапах постгипотермического периода // Укр. биохим. журн. 1987. Т.59. № 4. С. 91-93.
32. Рева А.Д., Березин В.А., Черная А.А., Лоханская Н.Ч. Катепсины Д и В лизосом мозга различных животных // В кн.: Механизмы пластичности мозга. Махачкала. 1982. С. 82.
33. Самотруева М. А. Экспериментальные модели поведения / М. А. Самотруева, Д. Л. Теплый, И. Н. Тюренков // Журнал функциональных и прикладных исследований. 2009. № 2 (27).
34. Скрипников А. Ю. И др. Поиск и идентификация пептидов мха *Physcomitrella patens* // Биоорганическая химия. 2011. Т. 37. С. 95- 104.
35. Соловьев В. Б, Генгин М. Т. Лабораторный практикум «Физико-химические методы исследований»: учебно - методическое пособие для студентов 3 курса специальности «Биохимия» // сост. Пензенский государственный педагогический университет имени В. Г. Белинского. Пенза. 2012.С. 72.
36. Стручкова И.В., Кальясова Е.А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле: Электронное учебно-методическое пособие. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет.2012. С.60.
37. Тихомирова А. Л. Перестройка онтогенеза как механизм эволюции насекомых //М.: Наука. 1991. С.168.
38. Филиппович Ю. Б., Минина Н. И. Ферменты насекомых // Биологическая химия (Итоги науки и техники). М.: ВИНТИ.1976. Т. 9.С. 21.
39. Хавинсон В.Х., Шатаева Л.К., Чернова А.А. Влияние регуляторных пептидов на транскрипцию генов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2003Т.136 № 9. С. 328-330.
40. Хеншен А., Хупе К.П., Лотшпайх Ф., Вельтер В. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии // М.: Мир.1988.
41. Херольд Э. Новый курс пчеловодства // М.: АСТ «Артель». 2007. С.368.

42. Хомутов А.Е., Пурсанов К.А., Перепелюк З.В. Регуляторные пептиды // Учебно-методическое пособие. Н. Новгород: Изд-во ННГУ.2014. С.73.
43. Ярыгин Д. В., Крылова И. Д., Конищев А. С., Филиппович Ю. Б. Исследование внутриклеточной локализации протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов в грене тутового шелкопряда // Современные наукоемкие технологии. №9. 2008.С.2.
44. Allen M.D. Drone brood in honey bee colonies // Z. Bienenforsch. 1958. 51. P.46–48.
45. Allsopp M.H., Calis J.N.M., Boot W.J. Differential feeding of worker larvae affects caste characters in the cape honeybee, *Apis mellifera capensis* // Behav Ecol Socio boil. 2003. 54. P.555–561.
46. Almenoff J., Orłowski M. Biochemical and immunological properties of a membrane-bound brain metalloendopeptidase: comparison with thermolysin-like kidney neutral metalloendopeptidase // J. Neurochem. 1984. 42. N 1. P. 151-157.
47. Almenoff J., Wilk S., Orłowski M. Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981. 102. N 1. P. 206-214.
48. Ament SA, Corona M, Pollock HS, Robinson GE. Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies // Proc Natl Acad Sci USA. 2008. 105. P.4226–4231.
49. Amsterdam J.G.C., Buuren K.J.H., Soubijn W. Purification and characterization of enkephalin-degradating enzymes from calf-brain striatum // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983. 115. N 2. P. 632-641.
50. Anson M. The estimation of pepsin, tripsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gen.Physiol. 1938. 22. P. 79–84.
51. Antonova, Y., Arik, A. A., Moore, W., Riehle, M. and Brown, M. R. Insulinlike Peptides: Structure, Signaling and Function // London: Academic Press 2012.

52. Avilés Fx., Guash A., Vendrell J. Activación de precursores de proteínas // Invest. Cienc. 1994. 210. P. 74-81.
53. Azaryan A.V., Hook V.Y.H. Distinct properties of prohormone thiol protease (ptp) compared to cathepsin B, cathepsin L, and cathepsin H - evidence for ptp as a novel cysteine protease // Arch. Biochem. Biophys. 1994. 314. N 1. P. 171-177.
54. Barrett A.J. Peptidases: a view of classification and nomenclature // MCBU 1999. 5. P.1–12.
55. Begna D, Fang Y, Feng M, Li J. Mitochondrial proteins differential expression during honeybee (*Apis mellifera* L.) queen and worker larvae caste determination // J Proteome Res. 2011. 10. P.4263–4280.
56. Begna D, Han B, Feng M, Fang Y, Li J. Differential expressions of nuclear proteomes between honeybee (*Apis mellifera* L.) queen and worker larvae: a deep insight into caste pathway decisions // J Proteome Res .2012. 11. P.1317–1329.
57. Berger B., Crailsheim K., Leonhard B. Proline, leucine and phenylalanine metabolism in adult honeybee drones (*Apis mellifica carnica* Pollm) // Insect Biochem. Mol. Biol. 1997. 27. P. 587–593.
58. Bishop G.H. Growth rates of honeybee larvae // J. Exp. Zool. 1961. 146. P. 11–20.
59. Blanco-Labra, A., Martinez-Gallardo, N.A., Sandoval-Cardoso, L., Delano-Frier, J. Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* Larvae (Herbst) // Insect Biochem. Mol. Biol. 1996. 26. P. 95–100.
60. Bounias M., Debevec M., Popeskovic D. A comparison of haemolymph lipid classes at different stages of honeybee development // Acta Vet. (Beograd) 1985. 35. P. 273–282.
61. Bond J.S., Butler C.P.E. Intracellular proteases // Ann. Rev. Biochem. 1987. 56. P. 333-364.
62. Bowen-Walker P.L., Gunn A. The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water,

- protein, carbohydrate, and lipid levels // *Entomol. Exp. Appl.* 2001.V.101. P.207–217.
63. Bozic J., Woodring J. Effect of activity on the haemolymph sugar titres in honey bees // *J. Apic. Res.* 1997. 36. P. 33–39.
64. Brouwers E.V.M. Glucose/fructose ratio in the food of honeybee larvae during caste differentiation // *J. Apic. Res.* 1984. 23. P. 94–101.
65. Brouwers E.V.M., Ebert R., Beetsma J. Behavioural and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honeybee // *J. Apic. Res.* 1987. 26. P. 11–23.
66. Butler C, Callow R, Johnston NC The isolation and synthesis of queen substance, 9-oxodec-trans-2-enoic acid, a honeybee pheromone // *Proc Royal Soc London B Biol Sci* .1962.155. P. 417–432.
67. Calderone N.W., Kuenen L.P.S. Differential tending of worker and drone larvae of the honey bee, *Apis mellifera*, during the 60 hours prior to cell capping // *Apidologie* 34.2003. P. 543–552.
68. Chan QWT, Foster LJ Changes in protein expression during honey bee larval development // *Genome Biol* 9. 2008. P. 156.
69. Buczek K., Chmielewski M., Pliszczynski M. Immunity of the honey bee (*Apis mellifera* L.) in viral, bacterial and fungal infections // *Annales UMCS* 622007. P. 27-35.
70. Cho W. L., Tsao S. M., Hays A. R., Walter R., Chen J. S., Shigirevskaya E. S., Raikhel A. S. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. Iss. 19. P. 13311-13321.
71. Cho WL, Dhadialla TS, Raikhel AS. Purification and characterization of a lysosomal aspartic protease with cathepsin D activity from the mosquito. *Insect Biochem* 21.1991. P. 165–176.
72. Coelho J.R. Heat transfer and body temperature in honey bee (Hymenoptera: Apidae) drones and workers // *Environ. Entomol.* 1991. 20. P. 1627–1635.

73. Coelho J.R. The flight characteristics of drones in relation to mating // *Bee Sci.* 4. 1996. P. 21–25.
74. Colonello N.A., Hartfelder K. Protein content and pattern during mucus gland maturation and its ecdysteroid control in honey bee drones // *Apidologie* 34(2003), 257–267.
75. Crailsheim K. The protein balance of the honey bee worker // *Apidologie* 21.1990. P. 417–429.
76. Crailsheim K., Schneider L.H.W., Hrasnigg N., Bühlmann G., Brosch U., Gmeinbauer R., Schöffmann B. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function // *J. Insect Physiol.* 38.1992. P. 409–419.
77. Collins AM, Caperna TJ, Williams V, Garrett WM, Evans JD Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating // *Insect Mol Biol* 15.2006. P. 541–549.
78. Croall D.E., DeMartino G.N. Purification and characterization of calcium-dependent proteases from rat heart // *J. Biol. Chem.* 1983. 258.N 9. P. 5660-5665.
79. Currie R.W. The biology and behaviour of drons // *Bee World.* 1987. V. 68. №3. P. 129-143.
80. Czoppelt Ch., Rembold H. Vergleichende Analyse des Kohlenhydratstoffwechsels bei den Kasten der Honigbiene, *Apis mellifera* // *J. Insect Physiol.* 16.1970. P. 1249–1264.
81. Dalbey R.E., Heijne G. Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes: A new protease family // *Trends. Biochem. Sci.* 1992. 17.N 11. P. 474-478.
82. Davies D. R. The structure and function of the aspartic proteinases // *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1990. 19. P. 189–215.
83. De Lima, Brochetto-Braga. Proteolytic activity of africanized honeybee (*Apis mellifera*: hymenoptera, apidae) venom// *J. Venom. Anim. Toxins* vol.6 n.1 Botucatu, 2000.
84. Dean R.T., Barret A.J. Lysosomes // *Essays Biochem.* 1976. 12. P. 1

85. Devi L. Tissue distribution of a dynorphin-processing endopeptidase // *Endocrinology*. 1993. 132. N 3. P. 1139-1144.
86. Deacon R. M. J. Appetitive position discrimination in the T-maze / R. M. J. Deacon // *Nature Protocols*. 2006. Vol. 1, № 1. P. 13–15.
87. Dorrah MA, Yousef HA, Bassal TT. Partial characterization of acidic proteinase in the midgut of *Parasarcophaga surcoufi* larvae (Diptera: Sarcophagidae) // *J Egypt Soc Parasitol* 30.2000. P. 643–653.
88. DuPraw E.J. The honeybee embryo. In: Wilt F, Wessells NK (eds) *Methods in developmental biology* // Crowell Press. 1967. New York. P. 183–217.
89. Elmelegi M, Dorrah M, Bassal T. Aspartic and serinepeptidase activity in the midgut of the larval *Parasarcophaga hertipes* (Sarcophagidae, Cyclorrahapha, Diptera) // *Eflatounia* 6.2006. P. 1–9.
90. Elekonich M.M., Schulz D.J., Bloch G., Robinson G.E. Juvenile hormone levels in honey bee (*Apis mellifera* L.) Foragers: foraging experience and diurnal variation // *J. Insect Physiol.* 47.2001. P. 1119–1125.
91. Evans JD, Wheeler DE Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera* // *Proc Natl Acad Sci U S A* 96.1999. P. 5575–5580
92. Fang Y, Feng M, Han B, Qi Y, Hu H, Fan P et al. Proteome analysis unravels mechanism underling the embryogenesis of the honeybee drone and its divergence with the worker (*Apis mellifera lingustica*) // *J Proteome Res* 14.2015. P. 4059–4071
93. F r a c z e k R. The activity of nineteen hydrolases in extracts from *Varroa destructor* and in hemolymph of *Apis mellifera carnica* worker bees // *Journal of apicultural science* vol. 53 no. 1. 2009
94. Fraser A, Ring RA, Stewart RK. Intestinal proteinases in an insect, *Calliphora vomitoria* L // *Nature* 192.1961. P. 999–1000.
95. Free J.B., Williams I. H. Factors determining the rearing and rejection of drones by the honeybee colony // *Anim. Behav.* 23(1975), 650–675.

96. Fukuda H., Ohtani T. Survival and life span of drone honeybees // *Res. Popul. Ecol.* 19.197. P. 51–68.
97. Fyg W. Über die Lokalisation des Glycogens in den larvalen und pupalen Fettkörperzellen der Honigbiene // *Z. Bienenforsch.* 8.1965. P. 55–70.
98. Fusek, M., Větvička, V. Dual role of cathepsin D: ligand and protease // *Biomed.Papers* 149.2005. P. 43–50.
99. Gainer H., Russel J.T., Loh Y.P. The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing: The secretory vesicle hypothesis // *Neuroendocrinology.* 1985. 40. P. 171-184.
100. Garcia L, Saraiva Garcia CH, Calábria LK, Costa Nunes Da Cruz G, SÁNchez Puentes A, Bao SN et al. Proteomic analysis of honey bee brain upon ontogenetic and behavioral development. *J Proteome Res* 8.2009. P. 1464–1473
101. Gholamzadeh Chitgar. Identification and Characterisation of Gut Proteases in the Fig Tree Skeletoniser Moth, *Choreutis nemorana* Hübner (Lepidoptera: Choreutidae) // *Plant Protect. Sci.* Vol. 49, 2013. No. 1. P. 19–26
102. Glinski Z., Jarosz J. Alterations in haemolymph proteins of drone honey bee larvae parasitized by *Varroa jacobsoni* // *Apidologie* 15.1984. P. 329–338.
103. Gordon M.W., Deanin G.B. Protein synthesis by isolated rat brain mitochondria and synaptosomes // *J. Biol. Chem.* 1968. 243. P. 4222-4226.
104. Greenberg B, Paretsky D. Proteolytic enzymes in the house fly, *Musca domestica* (L.) // *Ann Entomol Soc Am* 48.1955. P. 46–50.
105. Grzywnowicz K., Ciołek A., Tabor A., Jaszek M. Profiles of body-surface proteolytic system of honey bee queens, workers and drones: Ontogenetic and seasonal changes in proteases and their natural inhibitors // *Apidologie* 40(1).2009. P. 4–19.
106. Gui, Z.Z., Lee, K.S., Kim, B.Y. Functional role of aspartic proteinase cathepsin D in insect metamorphosis // *BMC Dev. Biol.* 6. 49. 2006.
107. Hamakubo T., Kannagi R., Murachi T., Matus A. Distribution of calpain I and II in rat brain // *J. Neurosci.* 1986. 6. P. 3103-3111.

108. Harada M. High-performance liquid-chromatographic determination of peptidase activity toward proline-containing peptides // *Analyt. Chim. Acta.* – 1997. 352. N 1-3. P. 179-185.
109. Hackenthal E., Hackenthal R., Hilgenfeldt V. Isorenin, pseudorennin, cathepsin D and renin. A comparative enzymatic study of angiotensin-forming enzymes // *Biochem. Biophys. Acta.* 1978. V.522. P. 574-588.
110. Han B, Fang Y, Feng M, Hu H, Qi Y, Huo X et al. Quantitative neuropeptidome analysis reveals neuropeptides are correlated with social behavior regulation of the honeybee workers. *J Proteome Res* 14.2015. P. 4382–4393
111. Harbo J.R., Bolten A.B. Development times of male and female eggs of the honey bee // *Ann. Entomol. Soc. Am.* 74.1981. P. 504–506.
112. Harrison J.M. Caste-specific changes in honeybee flight capacity // *Physiol. Zool.* 59.1986. P. 175–186.
113. Hepperle C, Hartfelder K. Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development // *Naturwissenschaften* 88.2001. P. 113–116.
114. Hernández L.G., Lu B., Da Cruz G.C.N., Calábria L.K., Martins N.F., Togawa R et al. Worker honeybee brain proteome // *J Proteome Res* 11.2012. P. 1485–1493
115. Hook V.Y., Azaryan A.V., Hwang S.-R., Tezapsidis N. Proteases and the emerging role of protease inhibitors in prohormone processing // *FASEB J.* 1994. 8. P. 1269-1278.
116. Houseman JG, Downe AER. Cathepsin D-like activity in the posterior midgut of Hemipteran insects // *Comp Biochem Phys B* 75.1983. P. 509–512.
117. Hrassnigg N., Crailsheim K. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*) // *Apidologie*, Springer Verlag, 36 (2), 2005. P. 255-277.
118. Huang I.S., Tappel E. Cathepsin D isoenzymes from porcine spleens large scale purification and polypeptide arrangements // *J. Biol. Chem.* 1971. V.254. P. 11405-11417.

119. Ivanova E. Electroforetic investigations on the tissue and organ specificity of expression of water-soluble proteins of female imago forms of *Apis mellifera* L // *Genetics and Breeding*. 32 3-4. P. 23-27, 2003.
120. Ivanova E. Comparative electrophoretic investigation on the age and organ specificity of expression of soluble proteins of male imago forms of *Apis mellifera* // *L. Genetics and Breeding*. 2004.33.1-2. P. 23-28
121. Ivanova E, Dobrovolov I and Tersieva I. Variability of Isoelectrophoretic Spectra of Total Water- Soluble proteins Depending on Honeybee Susceptibility to *Bacillus* larvae // *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2001.7. P. 348-350.
122. Ivanova E and Stoykova T. Age specificity in expression of the fat body proteins in honeybee (*Apis mellifera* L.) During larval development // *Scientific works AU – Plovdiv*. 2005.3. P. 35-40.
123. Ivanova E, Popov P and Dobrovolov I. Elektrophoretische Untersuchungen der wasserlöslichen Proteine bei der Honigbiene *Apis mellifera* L. Im Verlauf der Ontogenese // *Apidologie*. 31. 2000.P. 679-687.
124. Jay S.C. The development of honeybees in their cells // *J. Apic. Res.* 2.1963. P. 117–134.
125. Jannuzzi J. Royal Jelly: mystery food // *Amer. Bee J.* 1990. №8. P. 532
126. Jianke Li, Jing Wu, Desalegn Begna Rundassa, Feifei Song, Aijuan Zheng, and Yu Fang .Differential Protein Expression in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Larvae: Underlying Caste Differentiation // *PLoS One*. 2010. 5(10). doi: 10.1371/journal.pone.0013455
127. John H. Law, Peter E. Dunn, Karl J. Kramer // *Insect Proteases and Peptidases*.
128. Kate E. Ihle, Olav Rueppell, Zachary Y. Huang, Ying Wang, M. Kim Fondrk, Robert E. Page, Gro V. Amdam. Genetic architecture of a hormonal response to gene knockdown in honey bees // *Journal of Heredity*. V.106. №2. P.155-165
129. Kay J. Intracellular protein degradation // *Biochem. Soc. Trans.* 1978. 6. N 4. P. 789-797.

130. Krell R. Faoagricultural services bulletin. 1996. № 124. P.409.
131. Krieger, T.J., Hook, V.Y.H. Purification and characterization of a cathepsin D protease from bovine chromaffin granules // *Biochemistry* 31.1992. P. 4223–4231.
132. Khan, A.R., Khazanovich-Bernstein, N., Bergmann, E.M., James, M.N.G. Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors // *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96.1999. P. 10968–10975.
133. Krajewska K., Hryniewiecka-Szyfter Z. Histological changes in the fat body of *Apis mellifera* L. during larval and pupal development // *Bull. Soc. Amis Sci. Lett. Poznan Ser. D, Sci. Biol.* 27.1988. P. 25–35.
134. Lambremont EN, Fish FW, Ashrafi S. Pepsin-like enzyme in larvae of stable flies // *Science* 129.1959. P. 1484–1485
135. Lemos FJ, Terra WR. Properties and intracellular distribution of a cathepsin D-like proteinase active at the acid region of *Musca domestica* midgut // *Insect Biochem* 21.1991. P. 457–465.
136. Li XC, Luo GH, Han ZJ, Fang JC. Molecular cloning and analysis of aspartic protease (AP) gene in Ty3/gypsy retrotransposon in different geographical populations of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) in China // *Acta Entomol Sinica* 57.2014. P. 530–537.
137. Lee T., Lin Y. Trypsin inhibitor and trypsin – like protease activity in air – or submergence – grown rice (*Oryza sativa* L.) Coleoptiles // *Plant Sci.* 106.1995. P. 43–54.
138. Lefebvre B, Timmers T, Mbengue M, Moreau S, Hervé C, Tóth K et al. A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection // *Proc Natl Acad Sci* 107.2010. P. 2343–2348
139. Leta M.A., Gilbert C., Morse R.A. Levels of hemolymph sugars and body glycogen of honeybees (*Apis mellifera* L.) from colonies preparing to swarm // *J. Insect Physiol.* 42.1996. P. 239–245.
140. Liu P, Wu J, Li H, Lin S. Economic Values of Bee Pollination to China's Agriculture // *Scientia Agricultura Sinica* 44(24).2011. P. 5117–5123

139. Li J, Zhang L, Feng M, Zhang Z, Pan Y. Identification of the proteome composition occurring during the course of embryonic development of bees (*Apis mellifera*) // *Insect Mol Biol* 18.2009. P. 1–9
141. Lipke H, Fraenkel G, Liener I. Growth inhibitors—effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum* // *J Agric Food Chem* 2.1954. P. 410–414.
142. Lockshin, R. A., “Lysosomes in Insects” in *Lysosomes in Biology and Pathology* // Dingle, I. T. And Fell, H. R., Eds. Vol. 1. North Holland. Amsterdam. 1969. p. 363.
143. Lowenberger C. Innate immune response of *Aedes aegypti* // *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31 .2001. P. 219–229.
144. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrought, A.G. Farr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* 1951.
145. Mackasmiel L.A.M., Fell R.D. (2000) Respiration rates in eggs of the honey bee, *Apis mellifera*, *J. Apic. Res.* 39. P. 125–135.
146. Malik M.N., Fenko M.D., Iqbal K., Wisniewski H.M. Purification and characterization of two forms of Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease from calf brain // *J. Biol. Chem.* 1983. 258, N 14. P. 8955-8962.
147. Marx R., Möbius I., Ulrich G.M., Czoppelt C., Rembold H. Changes in fat body ultrastructure during the fifth larval instar in workers, queens and drones of the honey bee, *Apis mellifera* L. // Eder J., Rembold N. (Eds.), *Chemistry and biology of social insects*, Verlag J. Peperny, München.1987. P. 86–87.
148. Mazrahi A. Nature - the on source for our nutrients and remedies // *Bee products: Properties, Application and Apitherapy /Program & Abstracts International Conference.* Israel. 1996. P. 31
149. Mehdi S., Angelastro M., Wiseman J., Bey P. Inhibition of the proteolysis of rat erythrocyte membrane proteins by a synthetic inhibitor of calpain // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. 157. P. 1117-1123.

150. Melampy R.M., Willis E.R., McGregor S.E. Biochemical aspects of the differentiation of the female honeybee (*Apis mellifera* L.) // *Physiol. Zool.* 13.1940. P. 283–293.
151. Metcalf, P., Fusek, M. Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site // *EMBO J.* 12. 1993. P. 1293–1302.
152. Michelette E and Engels W. Concentration of hemolymph proteins during postembryonic worker development of Africanized honey bees in Brazil and Carniolans in Europe // *Apidologie.* 26. 1995. P. 101-108.
153. Millican P.E., Kenny A.J., Turner A.J. Purification and properties of a neurotensin-degrading endopeptidase from pig brain // *Biochem J.* 1991. 276. N 3. P. 583-591.
154. Molan P.C. The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity // *Bee World* 73.1992. P. 5–28
155. Morse R.A., Strang G.E., Nowakowski J. Fall death rates of drone honey bees // *J. Econ. Entomol.* 60.1967. P. 1198–1202.
156. Nassel D., Homberg U. Neuropeptides in interneurons of the insect brain // *Cell Tissue Res*, 2006 - 326:P.1 24.
157. Neukirch A. Dependence of the life span of the honeybee (*Apis mellifica*) upon flight performance and energy consumption // *J. Comp. Physiol.* 146.1982. P. 35–40.
158. Notov, 2012. Modes of embryonization in the evolution of the ontogenesis of modular organisms // *Wulfenia* 19.2012. P. 15 –21
159. North, M.J. Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms // *Microbiol. Rev.* 46.1982. P. 308-340.
160. Orłowski M., Michaud C., Chu T.G. Soluble metalloendopeptidase from rat brain. Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides // *Eur. J. Neurochem.* 1983. 135, N 1. P. 81-88.
161. Panzenböck U., Crailsheim K. Glycogen in honeybee queens, workers and drones (*Apis mellifera carnica* Pollm.) // *J. Insect Physiol.* 43.1997. P. 155–165.

162. Parker Robert, Andony P. Melathopoulos, Rick White, Stephen F. Pernal, M. Marta Guarna, Leonard J. Foster «Ecological Adaptation of Diverse Honey Bee (*Apis mellifera*) Populations» Centre for High-Throughput Biology and Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, Vancouver, Canada // *J. PlosOne*. 2010.
163. Pendola S, Greenberg B. Substrate-specific analysis of proteolytic enzymes in the larval midgut of *Calliphora vicina* // *Ann Entomol. Soc. Am* 68(1975). P. 341
165. Phiancharoen, M., Wongsiri, S., Koeniger, N., Koeniger, G. Instrumental insemination of *Apis mellifera* queens with hetero-and conspecific spermatozoa results in different sperm survival // *Apidologie* 35.2004. P. 503–511
166. Quistad G., Adams M., Scarborough R. et al. Metabolism of proctolin, a pentapeptide neurotransmitter in insects // *Life Sci*. 1984. 34.P. 76-112.
167. Rabossi A, Stoka V, Puizdar V, Turk V, Quesada-Allué LA: Novel aspartyl proteinase associated to fat body histolysis during *Ceratitis capitata* early metamorphosis // *Arch Insect Biochem Physiol*. 2004. 57. P. 51-67.
168. Ravi, C., Jeyashree, A. Antimicrobial Peptides from Insects: An Overview // *Research in Biotechnology*, 2(5). 2011.P. 1-7.
169. Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases // *J. Biochem*. 1993.290. P. 205-218.
170. Rojo L. Isolation, biochemical characterization, and molecular modeling of American lobster digestive cathepsin D1 // *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 157.2010. P. 394–400.
171. Romanelli A, Moggio L, Montella RC, Campiglia P, Iannaccone M, Capuano F, Pedone C, Capparelli R. Peptides from Royal Jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins // *Journal of peptide science*. 2011. 17(5) .P. 52-101.
172. Saikhedkar N. Cathepsins of lepidopteran insects: Aspects and prospects// *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 64.2015. P. 51-59.
173. Seddigh S., Darabi M. Proteomics comparison of aspartic protease enzyme in insects // *Turkish Journal of Biology*. 2015.

174. Schacterle G., Pollack R. Simplified method for quantitative assay of small amounts of protein in biological material // *Anal. Biochem.* 51. 1973. P. 654–655.
175. Sharifi M. Identification and characterization of midgut digestive proteases from the rosaceous branch borer, *osphanteria coerulescens redtenbacher* (coleoptera: cerambycidae) // *J. Biochem.* 49. 2012. 1. P. 33–47.
176. Shiba H, Uchida D, Kobayashi H, Natori M: Involvement of cathepsin B- and L-like proteinases in silk gland histolysis during metamorphosis of *Bombyx mori* // *Arch Biochem. Biophys.* 2001, 390. P. 28-34.
177. Shrimpton C.N., Smith A.I. Soluble neutral metallopeptidases - physiological regulators of peptide action // *J. Peptide Sci.* 2000. 6, N 6. P. 251-263.
178. Shumaker T. T. S., Cristofolletti P. T., Terra W. R. Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae // *Apidologie.* 1993. V.24. Iss. 1. P. 3-17.
179. Seidah N.G., Chretien M. Proprotein and prohormone convertases of the subtilisin family - recent developments and future perspectives // *Trends Endocrinol. Met.* 1992. 3, N 4. P. 133-140.
180. Seidl R. Die Sehfelder und Ommatidien-Divergenzen der drei Kasten der Honigbiene (*Apis mellifera*) // *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 73(1980), 367.
181. Seeley T.D. *Honeybee Ecology* // Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 1985. P. 201.
182. Silva CP, Xavier-Filho J Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (BOH.) (Coleoptera: bruchidae) // *Comp Biochem Phys B.* 1991.99. P. 529–533.
183. Šimúth J., Bíliková K. Isolation of peptide fraction from honeybee royal jelly as antifaulbrood factor // *Apidologie* 32. 2001. P. 275-283
184. Sinha M. Pepsin-like activity in the midgut of *Sarcophaga ruficornis* and *Musca domestica* // *Appl Entomol Zool* 10.1975. P. 313–315.

185. Stabe H.A. The rate of growth of worker, drone and queen larvae of the honeybee, *Apis mellifera* Linn. // *J. Econ. Entomol.* 23.1930. P. 447–453.
186. Stabentheiner A., Kovac H. Contribution of worker bees of different age to active heat production in the brood nest of honeybee colonies // *Apidologie* 33. 2002. P. 499–500.
187. Stabentheiner A., Vollmann J., Kovac H., Crailsheim K. Oxygen consumption and body temperature of active and resting honeybees // *J. Insect Physiol.* 49. 2003. P. 881–889.
188. Strachecka A., Proteases on the body surface of honeybee *Apis mellifera* L. In cage and beehive // *A N N A L E Sunivers I Tat Is Mariae Curie – Skłodowska Lublin – Polonia*, 2011.
189. Strachecka A. J. The surface proteolytic activity in *Apis mellifera* // *Journal of Apicultural Science*. 2008. Vol. 52 No. 1.
190. Straus J. Die chemische Zusammensetzung der Arbeitsbienen und Drohnen während ihrer verschiedenen Entwicklungsstadien // *Z. Biol.* 56(1911), 347–397.
191. Sutter G.R., Rothenbuhler W.C., Raun E.S. Resistance to American foulbrood in honey bees. VII. Growth of resistant and susceptible larvae // *J. Invertebr. Pathol.* 12.1968. P. 25–28.
192. Tang J., Wong R. Evolution in the structure and function of aspartic proteases // *J. Cell. Biochem.* 1987. V. 33. P. 53-63.
193. Terra W.R., Ferreira C., Garcia E.S. Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases // *Insect Biochem* 18.1988. P. 423–434.
194. Thie N.M., Houseman J.G. Identification of cathepsin B, D and H in the larval midgut of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) // *Insect Biochem* 20.1990. P. 313–318.
195. Tokunaga K., Yoshida C., Suzuki K., Maruyama H., Futamura Y. Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats // *Biol. Pharm. Bull.* 2004. 27(2). P.189-192.

196. Turk, B., Turk, D., Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers // *BBA Protein Struct.* 2000. M. 1477. P. 98-111.
197. Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers // *BBA Proteins Proteom.* 2012. 1824. P. 68-88.
198. Volpicella M, Ceci LR, Cordewener J, America T, Gallerani R, Bode W, et al. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors // *Eur. J. Biochem.* 270.2003. P. 10-19.
199. Vorob'eva. Modern Evolutional Developmental Biology: Mechanical and Molecular Genetic or Phenotypic Approaches? // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2010. Vol. 41. No. 5. P.. 283–290.
200. Walter R.T., Clélia F. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function // *Comp.Biochem. Physiol.*1994. P. 1-62.
201. Wang G.H., Liu C., Xia Q.Y., Cathepsin B protease is required for metamorphosis in silkworm, *Bombyx mori* // *Insect Sci.* 15.2008. P. 201-208.
202. Wang, L.F., Chai, L.Q., He, H.J. A cathepsin Llike proteinase is involved in moulting and metamorphosis in *Helicoverpa armigera* // *Insect Mol. Biol.* 2010. 19. P. 99-111.
203. Ward C. W. // *Biochem. Biophys. Acta*, 1975. 391. P. 201,
204. Wheeler DE, Buck N, Evans JD. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera* // *Insect Mol. Biol.* 2006.15. P. 597–602.
205. Wheeler DE, Kawooya JK. Purification and characterization of honey bee vitellogenin // *Archives of Insect biochemistry and Physiology.* 1990.14. P. 253-267
206. Wielkopolan B, Walczak F, Podleśny A, Nawrot R, Obrepalska-Stęplowska A. Identification and partial characterization of proteases in larval preparations of the cereal leaf beetle (*Oulema melanopus*, Chrysomelidae, Coleoptera) // *Arch Insect Biochem.* 88.2015. P. 192–202.
207. Winston M.L. The biology of the honey bee // Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, London, England. 1987. P. 281.

208. Wilk S., Orłowski M. Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex // *J. Neurochem.* 1983. 40. P. 842-849.
209. Wolschin F, Amdam G.V. Comparative proteomics reveal characteristics of life-history transitions in a social insect // *Proteome Sci.* 5.2007. P. 10
210. Wolfson J.L., Murdock L.L. // *J. Chem. Ecol.* 1990. V. 16. № 8. P. 1089–1102
211. Ying Wang, Sergio V. Azevedo. Insulin-like peptides (AmILP1 and AmILP2) differentially affect female caste development in the honey bee (*Apis mellifera* L.) // *The Journal of Experimental Biology* 216.2013. P. 4347-4357. Published by The Company of Biologists Ltd doi:10.1242/jeb.085779.
212. Yonezawa, S., Takahashi, T., Wang, X., Wong, R., Hartsuck, J., Tang, J., Structures at the proteolytic processing region of cathepsin D // *J. Biol. Chem.* 263.1988. P. 16604–16611.
213. Yu, J., Wu, F.Y., Zou, F.M. Identification and functional analysis of the cathepsin D gene promoter of *Bombyx mori* // *Mol. Biol. Rep.* 41. 2014. P. 1623-1630.
214. Yue Hao, Jianke Li. Springer International Publishing Switzerland 2016 G.H. Salekdeh (ed.) // *Agricultural Proteomics Volume 1, 2013.* DOI 10.1007/978-3-319-43275-5\_12
215. Yucel, B., Acikgoz, Z., Bayraktar, H., Seremet, Ç. The effects of apilarnil (drone bee larvae) administration on growth performance and secondary sex characteristics of male broilers // *J. Anim. Vet. Adv.* 2011. Vol. 10 No.17. pp. 2263-2266.
216. Zheng A, Li J, Begna D, Fang Y, Feng M, Song F Proteomic analysis of honeybee (*Apis mellifera* L.) pupae head development // *PLOS ONE* 6.2011.
217. Zhong Zheng Gui .Functional role of aspartic proteinase cathepsin D in insect metamorphosis // *BMC Developmental Biology* 2006.6. P. 49.

218. Zhao XF, Wang JX, Wang YC: Purification and characterization of a cysteine proteinase from eggs of the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera* // *Insect Biochem Mol Biol* 1998. 28. P. 259-264.
219. Zolótowska K., Lipiński Z. The level of protein and activity of hydrolases after infection of honeybee larvae with entomopathogenic nematodes // *J. Apic. Sci.* 47. 2003. P. 31 - 37.
220. Zolótowska K., Lipiński Z. Activity of selected hydrolases in ontogeny of drone *Apis mellifera carnica* // *J. Apic. Sci.* 5. 2007. P. 95 – 99.
221. Zümrüt Açikgöz, Banu Yücel. Using facilities of apilarnil (bee drone larvae) in poultry nutrition // *Works of the Faculty of Agriculture and Food Sciences. University of Sarajevo.* 2016. Vol. LXI, No. 66/1. P.12-15
222. Zwilling, R., Pfeleiderer, G., Sonneborn, H.-H., Kraft, V., and Stucky, I. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1969. 28. P. 1275.